

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 72

TITRE DE LA THÈSE

ETUDE DE LA VALEUR DE L'ESPACE
LIQUIDIEN EXTRA-CELLULAIRE
DU TISSU AORTIQUE CHEZ LE LAPIN
MODIFICATIONS INDUITES PAR LA L-ADRENALINE
ET UN REGIME ATHEROGENE

THÈSE

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 18 Mai 1967
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Henri PERRIER

né le 4 Octobre 1941

à LYON

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553403_0005

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 72

TITRE DE LA THÈSE

ETUDE DE LA VALEUR DE L'ESPACE
LIQUIDIEN EXTRA-CELLULAIRE
DU TISSU AORTIQUE CHEZ LE LAPIN
MODIFICATIONS INDUITES PAR LA L-ADRENALINE
ET UN REGIME ATHEROGENE

THÈSE

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 18 Mai 1967
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Henri PERRIER

né le 4 Octobre 1941

à LYON

THÈSE DE LA THÈSE

ÉTUDE DE LA VALEUR DE L'ESPACE
MICROBIEN EXTRA-CELLULAIRE
DU TISSU ADHÉRENT CHEZ LE LAPIN
MODIFICATIONS INDUITES PAR LA P-AGRESSION
ET DU MÉCANISME AÉROGÈNE

PAR

M. DEBIE

Présentée à l'Université de Bruxelles en vue de l'obtention du grade de Docteur en Médecine

Le 15 Mars 1918

Par le Président de l'Université, M. le Professeur Dr. J. VAN DER MEULEN



ANÉE 1917 - 1918

DE L'ÉCOLE

1918

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut

M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen :

M. J. F. CIER

Assesseurs :

M. M. LEVRAT

M. J. DORCHE

Conseiller Administratif :

M. H. PRUVOST

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL - LEPINE - TRILLAT - GARIN - GATE -
MARTIN - GABRIELLE - SANTY - DUCLOS -
GUILLEMINET - HERMANN - ROCHET - POLLOSSON -
ENSELME - WERTHEIMER - SARROUY - BANSSILLON -
DECHAUME - LACROIX -

PROFESSEURS

MM. J. CIBERT	Clinique urologique
P. PONTUS	Physique biologique (détaché à Beyrouth)
M. CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
F. PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
R. FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio- vasculaires
P. CROIZAT	Clinique médicale C
P. MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
L. REVOL	Pharmacié galénique
H. PIGEAUD	Clinique obstétricale
J. BOURRET	Médecine du travail

MM. M. LEVRAT	Clinique médicale A
R. SOHLER	Bactériologie-Virologie-Immunologie-
G. NETIEN	Botanique et Cryptogamie
P. BERTRAND	Clinique chirurgicale C
A. BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
B. DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
L. ROCHE	Médecine légale et Déontologie
J. COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique
P. MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audiophonologie
L. PAUFIQUE	Clinique d'Ophthalmologie
H. THIERS	Clinique de dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
J. BRUN	Clinique de Pneumophtisiologie
J. CREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
M. DARGENT	Clinique carcinologique
M. BERGER (1)	Physique nucléaire appliquée à la Médecine
A. GUICHARD	Anatomie pathologique
P. GIRARD	Pathologie générale et expérimentale
M. GIRARD	Clinique médicale D
M. LATARJET	Anatomie
R. PEYCELON	Clinique chirurgicale B
A. VACHON	Pathologie médicale
P. GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
J. PAPILLON	Radiologie
M. JEUNE	Clinique médicale infantile et Hygiène du 1er âge
A. GONIN	Thérapeutique
P. MONNET	Clinique médicale infantile B
J. CHATONNET	Physiologie B
P. GUINET	Clinique endocrinologique
H. COLLET (1)	Chimie générale et pharmaceutique
A. TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
Ch. FREIDEL	Clinique stomatologique
J. MARION	Clinique de Chirurgie et d'Orthopédie infantiles
L. MANSUY (1)	Neurochirurgie
L. REVOL (1)	Hématologie
J. LECUIRE (1)	Neurochirurgie

(1) Professeurs à titre personnel.

MM. J. DORCHE	Matière médicale et Législation pharmaceutique
H. LIARAS (1)	Clinique chirurgicale propédeutique
L. PERRON	Chimie
J.F. CIER	Physiologie A
J. PERRIN	Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire
P. GOINARD (1)	Clinique thérapeutique chirurgicale et chirurgie expérimentale
P. MICHAUD	Clinique de chirurgie cardiaque
M. PONT (1)	Médecine générale
J. TRAEGER (1)	Pathologie métabolique et rénale
J. MATHIEU	Clinique gynécologique
G. FAUCON	Biologie médicale et Pharmacodynamie
A. BERTOYE	Clinique des maladies infectieuses
G. VIGNON	Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale
D. VINCENT	Biochimie appliquée
A. CIER	Pharmacodynamie
L. COLOBERT	Chimie biologique et médicale
X.....	Pathologie chirurgicale
X.....	Clinique neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
X.....	Physiologie et Pathologie obstétricales
X.....	Hygiène et Action sanitaire et sociale
X.....	Histologie et Embryologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique
ODDOUX	Botanique et Cryptogamie
DE SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du travail
THIVOLET	Hygiène
MALLEIN	Chimie analytique
PINET	Electro-Radiologie
COLOMB	Dermatologie

(1) Professeurs à titre personnel

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM. CREYSSSEL R.	Chimie biologique
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-Radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
de MOURGUES Fr.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE	Médecine générale
DELEUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-Radiologie diagnostic et thé- rapeutique
MICHEL	Anesthésiologie
FRANCOIS	Pédiatrie et Puériculture
NICHOULIER	Chirurgie générale
LAMBERT	Médecine générale
FRIES	Médecine générale
GILLY	Pédiatrie
ROBERT	Médecine générale
BOUCHET	Anatomie
BETHENOD	Pédiatrie
GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
KALB	Pneumo-phtisiologie
LARBRE	Pédiatrie
SOUSTELLE	Chirurgie générale
VIALA	Médecine générale
VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
GIROD	Histologie et Embryologie
GRAS	Chimie biologique
COLIN	Médecine Légale
BERTRAND	Chimie biologique
MARET	Chirurgie générale
VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie
CHOLLAT	Electro-radiologie
FLEURETTE	Bactériologie
FLANDROIS	Physiologie
MOREL	Hématologie
TERRET	Chirurgie thoracique et cardio-vascu- laire
FREDERICH	Pharmacologie

MM. DAUDET	Chirurgie infantile
BRUNE	Médecine générale et thérapeutique
LOMBARD-PLATET	Chirurgie générale
BOUVIER	Rhumatologie
FREYCON	Pédiatrie
LAPRAS	Neuro-chirurgie
PELLET	Physiologie
DUQUESNEL	Electro-radiologie
DEJOUR	Orthopédie et Traumatologie
MOULIN	Dermato-Vénérologie
PERRIN-FAYOLLE	Pneumo-Phtisiologie
PALIARD	Médecine générale et thérapeutique
MORGON	O.R.L.
PAUPERT-RAVAULT M	Ophtalmologie
MOTIN	Anesthésiologie
PASQUIER	Médecine générale et thérapeutique
VAUZELLE	Anatomie pathologique
CZYBA	Histologie et Embryologie
CABANAC	Physiologie
TOURAINÉ	Pneumo-phtisiologie
BEL	Médecine générale et thérapeutique
CHARVET	Gynécologie obstétrique
MAYER	Cancérologie
SISTERON	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
BRAILLON	Anatomie et Chirurgie générale
VILLIERS	Chirurgie générale
LOUISOT	Chimie biologique et Chimie des Explo- rations fonctionnelles
COURJON	Neuro-psychiatrie
MORNEX	Médecine générale

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM. FAVRE-GILLY	Hématologie
RIFTAT	Hygiène
ROLLET	Pharmacie galénique
BIZOLLON	Physique

AGREGES EN EXERCICE

MM. BONAMOUR	Ophtalmologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
NOTTER	Gynécologie obstétricale
de MOURGUES G.	Chirurgie générale

MM. DUMONT M.	Obstétrique
SCHOTT	Neuro-psychiatrie
DEVIC	Médecine générale
SAUBIER	Chirurgie générale
DURAND	Urologie
HUGONNIER	Ophtalmologie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
GARDE	Médecine générale
FAYSSE	Orthopédie
GAILLARD	O.R.L.
PERRIN A.	Médecine générale
NORMAND	Médecine générale
MOUNIER-KUHN A.	Chirurgie générale
CHASSARD	Electro-radiologie
GARNIER	Obstétrique
DUIAS	Stomatologie
SCHNEPP	Orthopédie
NOEL	Médecine générale

Examineurs de la Thèse :

Président : M. le Professeur D. VINCENT

Assesseurs : MM. A. PERRIN
J. GRAS
J.C. HENRY
D. GAUTHERON

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MA FEMME

A MA FILLE

A MES FRERES, A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR DANIEL VINCENT

Professeur de Biochimie Appliquée,

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

Ayant eu l'honneur de devenir
son assistant, nous avons pu apprécier sa haute
compétence toujours empreinte d'une grande
amabilité.

Nous le remercions d'avoir bien
voulu accepter de présider notre jury de thèse.

Qu'il veuille trouver ici,
l'assurance de notre profond et respectueux
attachement.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE A. PERRIN

Professeur Agrégé de Médecine Générale,

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

Il nous fait l'honneur de juger cette thèse.

Qu'il nous permette de lui adresser nos
remerciements et nos hommages respectueux.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE J. GRAS

Professeur Agrégé de Chimie Biologique,

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

Ses conseils judicieux et sa compétence
technique nous ont été précieux au cours de ce
travail dont il a guidé la réalisation.

Il nous est agréable de pouvoir le remercier
de l'accueil chaleureux et sympathique qu'il nous a
toujours réservé, et de l'intérêt qu'il n'a cessé de
nous témoigner.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE J. C. HENRY

Professeur Agrégé de Biochimie,

à la Faculté de Médecine de Besançon.

Nous avons eu le plaisir de travailler sous
sa direction pendant trois ans.

Il a été l'instigateur de ce travail et en
a suivi pas à pas la progression.

En souvenir des précieuses acquisitions que
nous avons pu faire à son contact, nous sommes
heureux de lui dire notre profonde gratitude.

MADemoiselle LE PROFESSEUR D. GAUTHERON

Professeur de Biochimie,
à la Faculté des Sciences de Lyon.

Elle a inspiré cette thèse, et
a suivi son élaboration avec un soin attentif.

Nous sommes fiers de la compter
parmi nos juges.

Nous la prions de trouver ici, le
témoignage de notre reconnaissance et de notre
admiration.

A Monsieur le Professeur Agrégé J. BERTRAND
Professeur Agrégé de Biochimie Appliquée,
à la Faculté Mixte de Médecine et Pharmacie de Lyon.

Avec notre respectueuse amitié.

Au Docteur P. MEROUZE, en souvenir des trois
années passées ensemble, au Laboratoire de Chimie
Biologique.

A Madame GUDEFIN. Nous la remercions pour son
aide efficace, et nous lui disons notre cordiale sympathie.

A Madame MAGRON, à Mademoiselle ROY, avec toute
notre amitié.

A Madame ROQUES, en la remerciant d'avoir participé
à la présentation de ce travail.

A NOS MAITRES

DE LA FACULTE DE MEDECINE DE LYON

ET DES HOSPICES CIVILS

INTRODUCTION

L'ensemble de l'expérimentation que nous avons effectuée s'intègre dans le cadre d'une étude générale intéressant le métabolisme énergétique du tissu aortique, et concernant plus précisément le renouvellement des nucléotides adényliques riches en énergie à partir du phosphate radioactif ^{32}P , ainsi que les variations de la vitesse de renouvellement de ces nucléotides sous l'influence de l'adrénaline et d'un régime athérogène.

Une telle étude implique nécessairement la détermination la plus rigoureuse possible de la valeur de l'espace extra-cellulaire de l'aorte. En effet, le précurseur des nucléotides étant le phosphate minéral intra-cellulaire, il importe de pouvoir connaître avec précision la concentration intra-cellulaire de ce précurseur. Cette détermination peut être menée à bien si l'on connaît la concentration du phosphate minéral extra-cellulaire, et la valeur exacte de l'espace extra-cellulaire du tissu étudié. La teneur en phosphate minéral intra-cellulaire est calculée par différence entre le phosphate minéral total et le phosphate minéral extra-cellulaire, compte tenu de la valeur de l'espace. Il a été démontré effectivement que pour des temps d'incubation courts, la pénétration du phosphate radioactif n'est pas rigoureusement linéaire, et la seule façon de limiter le risque d'erreur est de déterminer avec la plus grande exactitude la valeur de l'espace extra-cellulaire du tissu étudié.

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes attaché, dans le cadre de ce travail, à étudier dans un premier temps les différences techniques permettant d'aborder la détermination aussi exacte que possible de la valeur de l'espace extra-cellulaire du tissu aortique chez le lapin. Dans une deuxième partie de notre expérimentation, nous avons envisagé l'étude des modifications de la valeur de cet espace sous l'influence de l'adrénaline. Dans une troisième partie enfin, nous avons étudié la cinétique des variations de l'espace extra-cellulaire induites par l'administration, chez le lapin, d'un régime athérogène.

La mesure de l'espace extra-cellulaire de l'aorte de lapin a fait l'objet d'un travail récent de LORENZETTI & COLL. (23). Les valeurs obtenues sont très élevées ; nous verrons ce qu'il faut en penser au cours de notre discussion.

Nous citons ici, des travaux effectués sur divers tissus artériels.

L'aorte de rat a été étudiée par FRIEDMANN & COLL. (14). Ils ont mesuré l'espace de diffusion de l'inuline *in vivo* qui est de $319,66 \pm 3,22$ ml par kg de poids frais dégraissé. VALETTE & COLL. (35) mentionnent un espace de diffusion du brome radio-actif de $742 \pm 1,3$ ml par kg de poids frais.

NORMANN & COLL. (25) ont étudié la diffusion de l'inuline *in vitro* dans la carotide de chien. L'espace est de $37,49 \pm 1,99$. Avec le saccharose, il est de $39,19 \pm 1,92$. L'interprétation approximative d'une étude cinétique sur l'aorte de chien donne un espace de 45 % pour l'inuline, et de 53 % pour le saccharose.

Citons enfin PROSSER & COLL. (30) qui ont trouvé

un espace extra-cellulaire de 39 % dans la carotide de porc par mesure de surface sur une image obtenue au microscope électronique.

En ce qui concerne l'eau totale, des travaux ont été effectués sur l'aorte de lapin par VIDLAKORA & KLEINZELLER (36, 37). Les résultats sont les suivants :

- tissu frais : 217 ± 22 ml H_2O /100 g de poids sec, soit environ 68,5 % du poids frais,
- tissu placé 2 heures à 0° dans NaCl 0,154 M
 396 ± 32 ml H_2O /100 g de poids sec, soit environ 78 % du poids frais,
- tissu placé 2 heures à 0° dans NaCl 0,154 M puis 40 mn à 37° dans un milieu de Krebs-Ringer phosphate oxygéné : 307 ± 32 ml/100 g de poids sec, soit environ 75,4 % du poids frais,
- tissu placé 40 mn en milieu de Krebs-Ringer phosphate oxygéné : 247 ± 19 ml/100 g de poids sec, soit environ 71,2 % du poids frais.

Le bref rappel des travaux antérieurs sur les compartiments hydriques du tissu artériel de diverses espèces animales, montre qu'à l'heure actuelle nous ne possédons pratiquement pas de résultats d'ensemble.

Dans le travail que nous présentons, nous avons utilisé différentes méthodes de mesure, afin d'essayer de donner, pour l'aorte de lapin, des résultats assez complets concernant l'espace extra-cellulaire.

RAPPEL HISTOLOGIQUE

~~~~~

- Structure de l'aorte de lapin normal.
- Structure de l'aorte athéromateuse.
- Action de l'adrénaline.

~~~~~


AORTE DE LAPIN NORMAL

Nous rapporterons ici les conclusions des travaux en microscopie électronique de BIERRING & KOBAYASI (4) sur la structure de l'aorte thoracique.

Intima

Les cellules endothéliales reliées par le contact de leurs membranes forment une ligne continue, avec toutefois des dilatations localisées de l'espace intercellulaire. Il n'y a pas de membrane basale ; ceci impliquant une haute perméabilité qui peut être reliée à l'absence de vasa vasorum dans la media.

La couche sous-endothéliale est la partie comprise entre les cellules endothéliales et la première couche épaisse de tissu élastique. Elle est constituée de fibres élastiques ramifiées et de fibres collagènes éparses dans une substance fondamentale de basse densité (correspondant à une forte concentration en eau).

Média

La média forme un tube élastique autour de l'intima. Elle est composée de couches alternées de lamelles élastiques et de cellules musculaires lisses. On compte entre 24 et 27 couches élastiques dans la média de l'aorte de lapin. Les cellules musculaires lisses sont les seules cellules présentes dans la média. Elles sont disposées plus ou moins diagonalement entre les lamelles élastiques qu'elles relient. Les cellules sont séparées les unes des autres par des espaces contenant des fibres collagènes et élastiques. Il n'existe ni vaisseaux sanguins ni fibres nerveuses.

AORTE DE LAPIN ATHEROMATEUX

Nous résumons ici la description donnée par PERRIN et Coll. (29). Le lapin constitue très facilement des lésions aortiques importantes, après quelques semaines de régime hypercholestérolé. Sur le plan histologique, la plaque d'athérome évolue en plusieurs stades.

Dans les quinze premiers jours, on a pu montrer une légère surcharge en mucopolysaccharides de la couche sous intima avec de discrètes altérations de la limitante élastique. A côté de ces anomalies localisées, existe une discrète hyperplasie du tissu sous endothélial, réalisant de petits coussinets. On constate également des inclusions lipidiques dans les cellules endothéliales.

A la fin du premier mois, l'athérome devient macroscopiquement visible. Les plaques sont formées presque exclusivement de cellules xanthomateuses.

A partir du troisième mois, succède un stade de réaction conjonctive intense. La plaque devient fibreuse, la substance fondamentale très abondante, les fibres conjonctives de plus en plus nombreuses, et les inclusions lipidiques se raréfient.

Il faut signaler ici que cet aspect histologique de l'aorte athéroscléreuse du lapin est nettement différent de celui qui existe dans le tissu aortique humain. On peut pratiquement dire qu'il s'agit d'un aspect inversé.

AORTE SOUMISE A L'ACTION DE L'ADRENALINE

Les modifications histologiques de la paroi aortique du lapin sous l'action de l'adrénaline, ont été étudiées récemment par ANCLA et Coll. (2).

Après une injection unique, par voie intra-veineuse d'une dose relativement massive (50 µg/kg), des prélèvements sont faits à divers intervalles de temps (immédiatement après l'injection, 10 mn, 30 mn, 1 heure et 24 heures après l'injection). Les auteurs ont constaté trois sortes de lésions : oedème, nécrose, calcifications.

L'oedème peut être extra et intra cellulaire.

L'oedème extra-cellulaire s'exprime par un certain élargissement des espaces intersticiels entre les cellules musculaires de la média. L'oedème provoque aussi un décollement des cellules endothéliales qui s'écartent de la lame élastique interne, et s'en détachent lorsque la lésion s'accroît.

L'oedème intra-cellulaire peut revêtir différents aspects qui coexistent le plus souvent. Soit il est diffus, et le cytoplasme devient plus transparent ce qui traduit une raréfaction des organites intra-cellulaires. Soit il se forme des bulles cytoplasmiques par protrusion de la membrane cellulaire, qui entraîne une portion de cytoplasme. Soit il apparaît des vésicules intra-cytoplasmiques.

L'oedème atteint aussi les fibres élastiques, donnant une irrégularité de calibre et de densité.

La nécrose se présente sous forme de petits foyers non systématisés traduisant une lyse des éléments musculaires et élastiques.

Les calcifications sont des dépôts de précipitation au sein de petits foyers nécrotiques.

Les lésions atteignent l'aorte proximale (crosse et aorte thoracique), et respectent de façon plus ou moins

complète l'aorte abdominale. Elles touchent avec prédilection l'espace sous endothélial et la zone interne de la média. L'oedème se manifeste sur les prélèvements faits immédiatement après l'injection. Les foyers nécrotiques et calcifiés peuvent se voir au bout d'une heure.

ANCLA et Coll. pensent que l'existence d'un oedème suggère un trouble de la perméabilité cellulaire, et supposent que l'adrénaline agit sur la membrane en provoquant par exemple une modification de sa charge électrique, c'est-à-dire de sa perméabilité aux échanges ioniques.

METHODES GENERALES DE MESURE
DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE DES TISSUS

~~~~~

- Diffusion des traceurs extra-cellulaires.
- Cinétique de la pénétration de traceurs ioniques.
- Mesure de surface sur des coupes histologiques.

~~~~~


Pour déterminer la fraction liquidienne extra-cellulaire d'un tissu, on étudie essentiellement la diffusion de certaines substances.

Ces méthodes peuvent être classées en deux groupes :

- Dans l'un, on s'adresse à des substances qui diffusent uniformément dans le fluide extra-cellulaire sans pénétrer pour autant dans les cellules. On mesure le volume de distribution de ces traceurs en faisant le rapport des concentrations dans le tissu et dans le liquide baignant le tissu,

- L'autre groupe de méthodes utilise des substances qui pénètrent à l'intérieur des cellules, mais beaucoup plus lentement que dans le liquide interstitiel. La représentation graphique en fonction du temps, de la pénétration ou de la sortie du produit, donne une courbe à deux pentes qui permet de déterminer l'espace extra-cellulaire.

Enfin, on peut faire des mesures directes de la surface extra-cellulaire sur une image de coupe histologique.

ETUDE DE LA DIFFUSION DES TRACEURS EXTRA-CELLULAIRES

GENERALITES

Les substances utilisées doivent être solubles, non toxiques et non métabolisées par les tissus. Des produits très divers ont été employés. Les principaux sont : le thio-cyanate, l'inuline, le saccharose, et la sérum-albumine marquée à l'iode radio-actif (R.I.S.A.).

L'étude peut se faire *in vivo*, la substance étant injectée à l'animal, en général par voie veineuse ; et *in vitro*, le tissu étant placé dans un milieu isotonique contenant le traceur.

IN VIVO

Le traceur, à partir du sang, diffuse dans l'ensemble des liquides interstitiels de l'organisme. Le tissu à étudier est ensuite prélevé, et on détermine les concentrations respectives du traceur dans le tissu et dans le sérum. La perméabilité de la paroi capillaire pour les substances destinées à explorer l'espace liquidien extra-cellulaire implique qu'une fraction est perdue par élimination par voie urinaire. Le glomérule rénal est, en effet, un filtre dont les critères de perméabilité sont assez voisins de ceux des capillaires tissulaires. Donc, pour que la concentration du traceur soit maintenue constante, condition d'un bon équilibre de répartition entre le liquide vasculaire et le liquide interstitiel, la fraction perdue par voie rénale doit être recouverte soit par néphrectomie, soit par une perfusion continue équilibrant la fuite urinaire. Ceci est surtout important pour des produits à diffusion lente tels que l'inuline.

Notons au passage, que l'espace de diffusion

des traceurs extra-cellulaires peut être divisé en deux parties : le secteur vasculaire et le secteur intersticiel. Si l'on veut mesurer le seul secteur intersticiel, il faut déduire l'espace vasculaire, par exemple, en faisant un dosage d'hémoglobine dans le tissu.

IN VITRO

Le tissu est placé dans un liquide de survie contenant le traceur. Celui-ci diffuse dans l'espace liquidien extra-cellulaire, et s'y trouve à la même concentration que dans le liquide ambiant. Pour que la diffusion soit convenable, la coupe de tissu doit être assez mince ; si l'on étudie un organe, il faut réaliser des coupes de 0,5 à 1 mm d'épaisseur. L'étude, dans le temps, de la concentration du traceur dans le tissu, en prélevant des fragments de tissu à des temps donnés, permet d'obtenir une courbe en plateau. C'est-à-dire qu'après une période d'augmentation, la concentration devient maximum et reste, inchangée par la suite. A ce moment, la diffusion est complète. Le temps d'équilibration varie avec la substance utilisée.

La valeur de l'espace extra-cellulaire est calculée en faisant le rapport des concentrations dans le tissu et dans le liquide d'incubation ou le sérum. Les résultats s'expriment en millilitres par kilo de poids frais, en pourcentage par rapport au poids frais, ou encore en pourcentage par rapport à l'eau tissulaire totale déterminée par dessiccation. La difficulté dans ces méthodes réside dans le fait que l'on n'a jamais la certitude qu'une substance diffuse uniformément dans le fluide extra-cellulaire et ne pénètre pas à l'intérieur des cellules.

Ainsi, pour un tissu donné, les chiffres obtenus

varient avec le produit utilisé. Et peut-être est-il préférable, au lieu de parler d'espace extra-cellulaire, de dire: espace de diffusion du thiocyanate ou de l'inuline.

BOZLER & LAVINE (8) opérant sur l'estomac de grenouille obtiennent un espace de 27,8 % avec l'inuline. Ce chiffre est supérieur dans la proportion de 34 % avec le saccharose. Le fructose donne une valeur supérieure de 8 % à celle donnée par le saccharose.

PAPPIUS & ELLIOT (26) étudiant divers tissus trouvent toujours un espace de diffusion du thiocyanate et du saccharose supérieur à celui de l'inuline. Et même, dans des coupes de foie et de cortex rénal, une diffusion complète du thiocyanate dans la totalité du tissu.

BARR & MALVIN (3) opérant sur le jéjunum de chien obtiennent, après 4 heures d'incubation, les chiffres suivants (en pourcentage de l'eau totale) :

- Arabinose : 70,9 %
- Mannitol : 69,2 %
- Saccharose : 47,8 %
- Raffinose : 49,4 %
- Inuline : 43,6 %
- Sérum albumine marquée : 19,3 %

On peut émettre l'hypothèse que le volume de distribution diminue quand la taille de la molécule augmente. Les petites molécules pénétreraient plus ou moins à l'intérieur des cellules ; ce qui ne semble pas douteux dans l'exemple précédent pour l'arabinose et le mannitol. Mais on peut estimer également qu'une grosse molécule n'est pas

forcément arrêtée, mais diffuse plus difficilement dans les fins interstices existant entre les cellules ; ce qui est peut-être le cas de l'albumine marquée.

Il faut aussi considérer que la dissection, la préparation des coupes et l'agitation, lorsqu'on opère in vitro, peuvent lèser les cellules. De plus, il se produit un gonflement variable suivant les tissus probablement d'origine extra-cellulaire. Pour toutes ces raisons, PAPPUS & ELLIOT (26) préfèrent déterminer l'espace non-inuline qui est la différence entre l'eau totale et l'eau équilibrée avec l'inuline, et qu'ils considèrent comme une bonne mesure de l'espace intra-cellulaire intact. L'espace de diffusion de l'inuline comprenant l'espace extra-cellulaire et l'espace "endommagé".

Un point qui semble très important quant aux erreurs possibles est le mode de séchage du tissu avant de le peser. Il faut qu'il soit débarrassé totalement du liquide d'incubation. Dans le cas d'un tissu résistant comme le tissu artériel une dissection soigneuse et le séchage avec un papier filtre assez compact sont suffisants. Par contre, les tissus fragiles doivent être traités avec plus de précautions.

PAPPUS & ELLIOT (26) qui ont opéré sur des coupes de cerveau, placent le tissu sur un filtre percé en appliquant une légère aspiration ; le liquide restant est ensuite éliminé par capillarité en appliquant une pointe de papier filtre.

Nous allons maintenant envisager les principes d'utilisation et les méthodes de détermination des principaux traceurs.

Méthode à l'inuline

L'inuline est un polyside, d'origine végétale, constitué d'une trentaine d'unités de fructose, dont le poids moléculaire est d'environ 5 000. L'étude de la diffusion de cette substance a été pratiquée par de nombreux auteurs sur des tissus très divers.

IN VIVO

L'inuline est rapidement éliminée dans les urines ; il faut donc procéder soit à la néphrectomie bilatérale, soit à la ligature des pédicules rénaux, soit à une perfusion continue adaptée à la fuite rénale (COTLOVE (10) : 0,042 ml par minute et par 100 g de poids d'une solution à 7,5 % chez le rat). FRIEDMANN & ses collaborateurs (14) ont déterminé l'espace extra-cellulaire de l'aorte de rat en injectant 0,5 ml pour 100 g de poids d'une solution d'inuline à 12 %. L'animal, après ligature des pédicules rénaux, est maintenu sous anesthésie barbiturique pendant trois heures.

IN VITRO

Le tissu ou la coupe de tissu est placé dans une solution tampon isotonique et oxygénée contenant de 0,3 % à 1 % d'inuline. L'incubation peut se faire à des températures variables ; soit à 0° C, soit à la température du laboratoire, soit enfin, à 37-38° C. Le temps d'incubation est variable selon les auteurs ; il est en général de une à deux heures, à 37° C.

BOZLER & LAVINE (8), dans le cas de l'estomac de grenouille, obtiennent l'équilibration en 50 mn.

Pour BARR & MALVIN (3), dans le jéjunum de chien,

l'équilibration se fait entre 20 et 40 mn.

En ce qui concerne le dosage dans les tissus, plusieurs procédés peuvent être utilisés : soit le broyage dans une solution d'acide trichloracétique suivi d'une centrifugation, et prélèvement du liquide surnageant ; soit la diffusion dans l'eau : le tissu est alors placé pendant plusieurs heures dans de l'eau distillée avec agitation continue ; enfin le tissu peut être solubilisé par chauffage dans une solution alcaline.

Les méthodes de dosage sont très nombreuses. Par chauffage, en milieu acide, l'inuline sous forme de fructose est deshydratée en hydroxyméthylfurfural qui conduit à des produits de condensation fortement colorés avec des amines et des phénols.

Les protéines sont précipitées soit par l'acide trichloracétique, soit par le réactif de SOMOGYI (34).

ALVIN, RUBIN et MILLER (1) utilisent la coloration bleue avec la diphénylamine en solution alcoolique en présence d'acide chlorhydrique au bain-marie bouillant. L'inconvénient de cette méthode est que le glucose donne aussi la coloration, et il faut l'éliminer du milieu par fermentation directe par de la levure.

KENDALL, YOUNG & RAISZ (21) utilisent l'anthrone en solution dans l'acide sulfurique, ainsi préparée :

- 4 g d'anthrone dissous dans 250 ml d'acide sulfurique concentré sont mélangés à de l'acide dilué (500ml d'acide sulfurique concentré + 250 ml d'eau) ; il faut éviter l'échauffement qui détruirait le réactif.

- 2 ml de solution à doser contenant de 15 à 45 μ g d'inuline avec 10 ml de réactif à l'anthrone sont portés au bain-marie à 75° pendant 5 mn. La lecture colorimétrique se fait à 630 m μ .

HUBBARD & LOOMIS (20) mesurent à 450 m μ la coloration donnée par l'inuline avec la résorcine à 0,1 % dans l'alcool à 95°, en présence d'acide chlorhydrique à 30 % au bain-marie à 80° C pendant 8 mn.

La méthode de HIGASHI & PETERS (19) est très voisine, qui utilise l'acide chlorhydrique à 37%, et contenant 7,5 mg/l de chlorure ferrique ; le développement de la coloration se fait à 79° C pendant 20 mn et la lecture à 480m μ ;

SCHREINER (33) porte au bain-marie pendant 20 mn avec lecture à 490 m μ .

ROE, EPSTEIN & GOLDSTEIN (31) utilisent la résorcine à 0,1 % dans de l'acide acétique glacial contenant 0,25 % de thiourée en présence d'acide chlorhydrique concentré. Le développement de la coloration s'effectue à 80° C pendant 10 mn ; on photomètre à 520 m μ .

ROSS & MOKOTOFF (32) emploient les mêmes réactifs que ROE & coll. Leur méthode s'applique au dosage dans les tissus ; ceux-ci étant dissous dans la soude diluée et chaude. Ce traitement par la soude (pratiqué aussi dans la méthode à l'anthrone) a en plus l'avantage de détruire le glucose et d'autres substances chromogènes pouvant intervenir dans la réaction. Mais, il est alors nécessaire d'utiliser une forme d'inuline alcali-stable. La méthode de ROSS & MOKOTOFF est celle que nous avons utilisée, nous la décrirons en

détail dans la partie expérimentale de notre travail.

Plus récemment, PERCHERON (27, 28) a utilisé la coloration jaune donnée avec l'acide thiobarbiturique. ZENDER & FALBRIARD (40) ont amélioré la technique par quelques modifications de détail. Après déprotéinisation par le sulfate de cadmium et la soude, 200 μ l de surnageant avec 10 μ l de soude 2N sont portés 15 mn au bain-marie bouillant. On ajoute 300 μ l de réactif (2 g d'acide thiobarbiturique dans 1 litre d'acide chlorhydrique concentré de densité 1,19) et on porte au bain-marie à 83° C pendant 5 mn. On refroidit immédiatement, et on lit 45 mn après à 435 m μ . Cette méthode permet de doser des quantités plus faibles que celle de ROE & Coll. Le glucose interfère légèrement ; mais il donne une coloration 70 fois moindre. On peut apporter des facteurs de correction en mesurant les sucres réducteurs totaux.

Enfin, on peut faire des mesures de radio-activité en utilisant de l'inuline marquée au carbone 14 (3, 6, 13, 17).

Méthode au saccharose

On utilise le saccharose in vivo après néphrectomie ou en maintenant une perfusion continue (10).

In vitro, il est employé en solution isotonique que l'on ajoute au milieu d'incubation. D'assez larges variations de la concentration finale n'ont pas d'effets sur les résultats obtenus (8).

Le dosage peut porter sur le glucose après inversion. Généralement, on dose le fructose et les méthodes

sont les mêmes que pour l'inuline. On peut, également, utiliser le saccharose sous forme radio-active. (3, 6, 17)

De nombreuses substances glucidiques ont également été utilisées ; en particulier, sous forme radio-active, marquées au carbone 14 :

- Fructose (8)
- Xylose (17)
- Arabinose (3, 13)
- Erythritol (13)
- Mannitol (3, 13)
- Raffinose (3)

Le principe de leur utilisation est le même que précédemment.

Méthode à la sérum albumine marquée à l'iode radio-actif

Cette méthode (3,13) ne s'applique qu'aux études in vitro, puisque l'albumine ne franchit pas la membrane capillaire. La diffusion est très longue, de l'ordre de 4 heures. C'est le traceur qui donne les valeurs les plus faibles. Etant donné la taille de la molécule, on peut être certain qu'elle ne pénètre pas dans les cellules ; mais on ne peut affirmer que la diffusion dans l'espace extra-cellulaire soit totale.

Méthode au thiocyanate

Le thiocyanate, bien que très utilisé pour la mesure du secteur extra-cellulaire d'organismes entiers, a été assez peu employé pour les mesures sur les organes isolés. On l'utilise sous forme de sels d'ammonium ou de sodium.

IN VIVO

On injecte 20 mg pour 100 g de poids par voie veineuse. La néphrectomie n'est pas nécessaire car le thiocyanate diffuse très vite, et on peut sacrifier l'animal au bout de 6 à 10 mn (23).

IN VITRO

Le thiocyanate est employé à une concentration finale dans le milieu d'incubation de 0,15 % (26).

Le dosage met à profit la formation d'un complexe coloré avec le nitrate ferrique en solution dans l'acide nitrique dilué. GRANDALL & ANDERSON (11) emploient :

- nitrate ferrique : 50 g
- acide nitrique : 25 g
- eau q.s.p. : 1000 ml

La méthode de BOWLER (7) est bien préférable avec :

- nitrate ferrique : 80 g
- acide nitrique M q.s.p. : 500 ml

On emploie une plus grande concentration de nitrate ferrique et d'acide nitrique ; la loi de Beer-Lambert s'applique alors parfaitement ; on mélange à parties égales la solution à doser et le réactif dans la cuve du photomètre, car la lumière affaiblit rapidement l'intensité de la coloration. La lecture se fait à 470 mμ.

On peut également utiliser le thiocyanate radioactif (6).

Signalons enfin que l'on a mesuré comme valeur de l'espace extra-cellulaire, l'espace de diffusion de certains ions (Brome, Sodium, Chlore) sous forme naturelle ou d'isotopes radio-actifs. En prenant pour hypothèse la répartition exclusivement extra-cellulaire de ces ions. Malheureusement, cette hypothèse est inexacte, en particulier, dans le cas du muscle lisse. Les valeurs obtenues, très élevées, correspondent de toute évidence, à une pénétration intra-cellulaire. (35)

DANIEL & ROBINSON (12) ont utilisé le dosage du chlore, mais en employant des facteurs de corrections. Ils déterminent le chlore lié, non ionisé, en plaçant le tissu dans un liquide dépourvu de chlore, et en dosant le chlore résiduel dans le tissu. La concentration intra-cellulaire du chlore est considérée comme étant dans le rapport de 1/6,5 par rapport à la concentration extra-cellulaire connue (avec l'hypothèse d'un potentiel de Donnan de 50 mV).

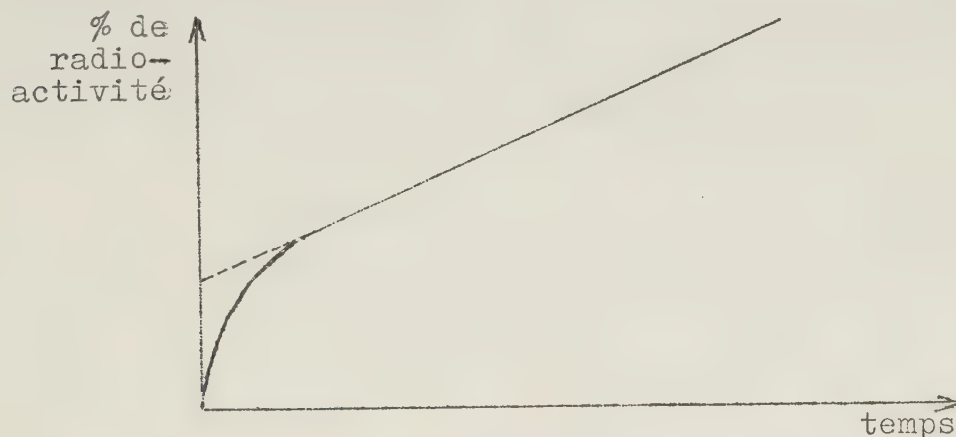
Cependant, les ions sont fréquemment utilisés pour mesurer l'espace extra-cellulaire d'un tissu, mais selon des modalités différentes, et que nous allons maintenant envisager.

ETUDE CINETIQUE DE LA PENETRATION DE TRACEURS IONIQUES

Dans ces méthodes, il s'agit non pas de déterminer le volume de distribution d'une substance, mais d'étudier sa vitesse de pénétration. Les traceurs sont des ions qui pénètrent dans les cellules à une vitesse différente de celle à laquelle ils passent dans l'espace extra-cellulaire.

On s'adresse soit à des ions étrangers au tissu (lithium), et qui peuvent être utilisés sous forme naturelle; soit à des isotopes radio-actifs (^{24}Na , ^{38}Cl , ^{32}P).

Le tissu est placé dans un milieu d'incubation contenant le traceur. On détermine la concentration du traceur dans le tissu en pourcentage par rapport au liquide d'incubation en fonction du temps. On obtient une courbe à deux pentes. (Figure 1)



- fig. 1 -

La pente rapide correspond à la pénétration dans le fluide extra-cellulaire et la pente lente à l'entrée dans les cellules. Si l'on admet que le traceur se trouve à la même concentration dans le liquide extra-cellulaire et dans le milieu d'incubation, en extrapolant la deuxième partie de la courbe au temps 0, on obtient la valeur de l'espace extra-

cellulaire. L'aspect de la courbe peut légèrement varier suivant les ions, certains pénétrant plus rapidement que d'autres ; mais on observe toujours deux parties distinctes.

VOLFIN, CLAUSER & EBOUE (38) ont déterminé l'espace extra-cellulaire de l'utérus de rat à l'aide de phosphate marqué au 32 P. Ils déterminent la radio-activité sur l'extrait trichloracétique de l'organe, après minéralisation, exprimée en pourcentage de la radio-activité du milieu d'incubation traité par l'acide trichloracétique et sans minéralisation. L'équilibre entre l'espace extra-cellulaire et le milieu d'incubation est réalisé en moins de deux minutes. Ils obtiennent une valeur voisine de celle donnée par la diffusion du thiocyanate (24).

GOODFORD & HERMANSEN (16) ont étudié l'espace extra-cellulaire de bandelettes musculaires (taenia coli) de l'intestin de cobaye. La valeur est de 40 % avec le lithium ; et de 70 % avec le 24 Na, ce qui est probablement une valeur erronée, cet ion pénétrant extrêmement vite.

On peut faire l'étude inverse, c'est-à-dire étudier la vitesse de sortie d'un ion présent naturellement dans le tissu ; le tissu étant placé dans un liquide ne contenant pas l'ion à étudier. On mesure l'apparition de l'ion dans le liquide d'incubation.

BITMAN & COLL. (5) ont mesuré l'espace extra-cellulaire de l'utérus de lapine en étudiant la vitesse de sortie du sodium. Le tissu est immergé dans 25 ml de solution de glucose à 5 % oxygénée. Des portions aliquotes de 2 ml sont prélevées à des intervalles de temps réguliers et remplacées par 2 ml de solution de glucose. Le sodium est déterminé par

photométrie de flamme. La courbe d'élimination montre deux pentes : une pente rapide de diffusion à partir de l'espace extra-cellulaire, et une pente lente correspondant à la sortie du sodium présent dans les cellules. On extrapole la deuxième pente au temps zéro, ce qui donne la quantité de sodium extra-cellulaire présent dans le tissu. L'eau extra-cellulaire est mesurée en faisant le rapport avec la concentration du sodium extra-cellulaire. Cette dernière étant égale à la concentration dans le sérum multipliée par 0,95 (facteur de correction de Donnan).

MESURE DE SURFACE SUR DES COUPES HISTOLOGIQUES

PROSSER & COLL. (30) ont étudié l'espace extra-cellulaire de divers tissus à partir de coupes histologiques. Le cliché obtenu au microscope électronique avec un grossissement de 10 000 fois est tiré sur papier et agrandi 4 fois. Les auteurs mesurant la surface extra-cellulaire au moyen d'une grille de 1 mm²,

GOODFORD & HERMANSEN (16) ont également fait des mesures planimétriques pour déterminer l'espace extra-cellulaire de taenia coli du cobaye.

L'inconvénient de ces mesures réside dans les modifications apportées par les techniques de fixation et de coupe, et qu'il est impossible d'évaluer.

Nous avons effectué de telles mesures sur des coupes observées au microscope optique, selon une technique personnelle que nous décrirons dans la partie expérimentale de notre travail.

TECHNIQUES UTILISEES

• • • • •

- Généralités.
- Diffusion de l'inuline.
- Diffusion du saccharose.
- Diffusion du thiocyanate.
- Cinétique de pénétration du phosphate marqué.
- Mesure de surface sur image de coupe histologique.

• • • • •

GENERALITES

Nous avons utilisé des lapins mâles, de race commune, pesant de 2,500 à 3,500 kg. Les animaux sont sacrifiés par fracture de la colonne cervicale ; après incision du thorax et de l'abdomen, l'aorte est immédiatement prélevée. Nos études ont porté sur l'aorte thoracique totale c'est-à-dire la crosse et l'aorte thoracique jusqu'au diaphragme ; l'aorte abdominale étant utilisée comme blanc-tissu.

Pour les études de diffusion in vivo, le traceur est injecté dans la veine marginale de l'oreille. Du sang est prélevé par ponction cardiaque, avant l'injection, pour faire un blanc-sérum. Lorsque le temps de diffusion est atteint, on sacrifie l'animal, on recueille du sang dans le coeur, et on prélève l'aorte. Elle est totalement débarrassée du tissu cellulo-grasieux périartériel, ouverte longitudinalement, soigneusement séchée au papier filtre, avant d'être pesée. Pour l'aorte thoracique totale, le poids est assez variable, en général de 300 à 500 mg.

Lors d'études in vitro, l'aorte est grossièrement débarrassée de son tissu grasieux et mise telle quelle dans le liquide d'incubation. Après le temps d'incubation, elle est soigneusement disséquée, ouverte longitudinalement, séchée et pesée.

Nous avons utilisé, comme milieu d'incubation, le liquide tampon bicarbonate de KREBS (22), préalablement saturé en O_2 - CO_2 avec le mélange O_2 95 % - CO_2 5 %. Ce liquide a la composition suivante :

-	100	volumes	de	NaCl	0,9 %
-	4	"	"	KCl	1,15 %
-	3	"	"	$CaCl_2$	1,22 %

1 volume	de	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	2,11 %
1	"	" $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	3,82 %
21	"	" CO_3HNa	1,3 %

Ce liquide se conserve au moins un mois à + 4° C.

L'aorte est placée dans un petit erlenmeyer de 25 ou 50 ml en présence de 10 ml de tampon de Krebs contenant le traceur.

Pour les études à 37°, nous avons utilisé le bain-marie et le système d'agitation d'un appareil de Warburg. Un dispositif spécial s'appuyant sur les porte-manomètres maintient les erlenmeyers dans le bain-marie. La saturation en $\text{O}_2\text{-CO}_2$ est maintenue par un courant gazeux passant dans les erlenmeyers qui sont munis de bouchons à double ouverture.

Nous n'avons pas réalisé d'étude cinétique de la pénétration des traceurs. Nous verrons, en effet, que l'espace extra-cellulaire de l'aorte varie de façon notable suivant le segment considéré, et, dans ces conditions, il est impossible de prélever des fragments de tissu à des intervalles de temps donnés. Nous avons tenté de faire des mesures sur des fragments obtenus en coupant l'aorte dans le sens de la longueur. Mais les valeurs obtenues après une heure d'incubation (42 à 59 %) très élevées, nous ont semblé correspondre à des lésions tissulaires au cours de la dissection, et nous n'avons pas poussé plus loin nos investigations. Il aurait donc fallu faire des mesures sur l'aorte totale, ce qui aurait nécessité un grand nombre d'animaux. De toute manière, les temps d'incubation choisis sont largement suffisants, et correspondent à ce que nous avons trouvé dans la littérature.

ETUDE DE L'ESPACE DE DIFFUSION DE L'INULINE

Le produit que nous avons utilisé est l'inuline purifiée Prolabo.

La méthode de dosage de ROSS & MOKOTOFF mettant en jeu la solubilisation du tissu par une solution de soude, il est indispensable de pouvoir disposer d'une forme d'inuline stable dans les solutions alcalines diluées et chaudes. Pour cela, nous avons appliqué la technique de purification de WEIL (39).

Une solution d'inuline du commerce à 10 % est portée au bain-marie bouillant pendant 30 mn en présence de soude, à raison de 5 ml de solution de soude concentrée pour 100 ml de solution d'inuline. Le mélange prend ainsi une coloration brune due sans doute à la caramélisation de l'inuline hydrolysée. On neutralise avec de l'acide chlorhydrique concentré. On purifie par précipitation à l'alcool à raison de 5 volumes d'éthanol à 95°, pour 1 volume de solution. Le mélange est centrifugé, le surnageant rejeté. Le précipité est redissous en ajoutant 75 % du volume d'origine d'eau distillée et en portant au bain-marie bouillant. La précipitation alcoolique est répétée 10 fois. On obtient, après passage à l'étuve, une poudre blanche, qui donne dans l'eau une solution pratiquement incolore.

On prépare une solution à 20 % que l'on garde au réfrigérateur. Au moment de l'emploi, on porte au bain-marie bouillant ; ainsi l'inuline est facilement soluble.

Pour le dosage de l'inuline, nous avons utilisé la méthode de ROSS & MOKOTOFF (32) en y apportant quelques sim-

plifications que nous signalerons au passage.

Le tissu aortique qui pèse de 300 à 500 mg (contenant de 0,3 à 1 mg d'inuline environ), est placé dans un tube gradué à 20 ml, bouchant à l'émeri avec 2,4 ml de soude 0,85 N. Le tube est placé au bain-marie bouillant jusqu'à solubilisation complète du tissu, c'est-à-dire environ 15 mn, en agitant à des temps réguliers. On neutralise par 0,8 ml d'HCl 2,5 N. Les protéines sont ensuite précipitées par le mélange de SOMOGGI (34) :

- 4 ml de Zn SO_4 , 7 H_2O 10 % et
- 4 ml de Na OH 0,5 N

On complète à 20 ml avec de l'eau distillée. On agite vigoureusement, on laisse reposer, et on filtre. On transfère 1 ml en double exemplaire dans des tubes fermés. On ajoute 0,33 ml de réactif à la résorcine (0,1 g de résorcine, 0,25 g de thicurée dans 100 ml d'acide acétique glacial). Cette solution se conserve au moins 2 mois dans un flacon en verre coloré, à l'obscurité), et 2 ml d'HCl concentré (densité 1,19). Les tubes sont placés au bain-marie à $80^\circ \text{C} \pm 1^\circ$ pendant 10 mn à l'obscurité. Les tubes sont ensuite refroidis dans l'eau et maintenus à l'abri de la lumière. On détermine la transmission lumineuse à 520 mμ.

Le liquide d'incubation est traité de la même façon en utilisant 0,1 ml prélevé avec une pipette de précision. Pour les études in vivo, le dosage porte sur 0,3 ml de sérum.

Réalisation des blancs :

* Electro-photomètre Jobin et Yvon, tricellule Congo.

Le tissu est également traité par la soude 0,85 N ; on y ajoute 1,2 ml d'acide chlorhydrique 5 N, et on laisse au bain-marie bouillant pendant 30 mn. Puis on met 2,6 ml de soude 4 N, et on laisse au bain-marie pendant 15 mn. On neutralise par 1,2 ml d'HCl 5 N. On précipite les protéines par le mélange de SOMOGYI et on filtre. On transfère 0,66 ml de filtrat (et non 1 ml, car il y aurait précipitation de ZnCl_2 du fait de la grande quantité de NaCl). On complète à 1 ml avec de l'eau distillée. On ajoute la résorcine et l'acide chlorhydrique, et on traite de la même façon que précédemment.

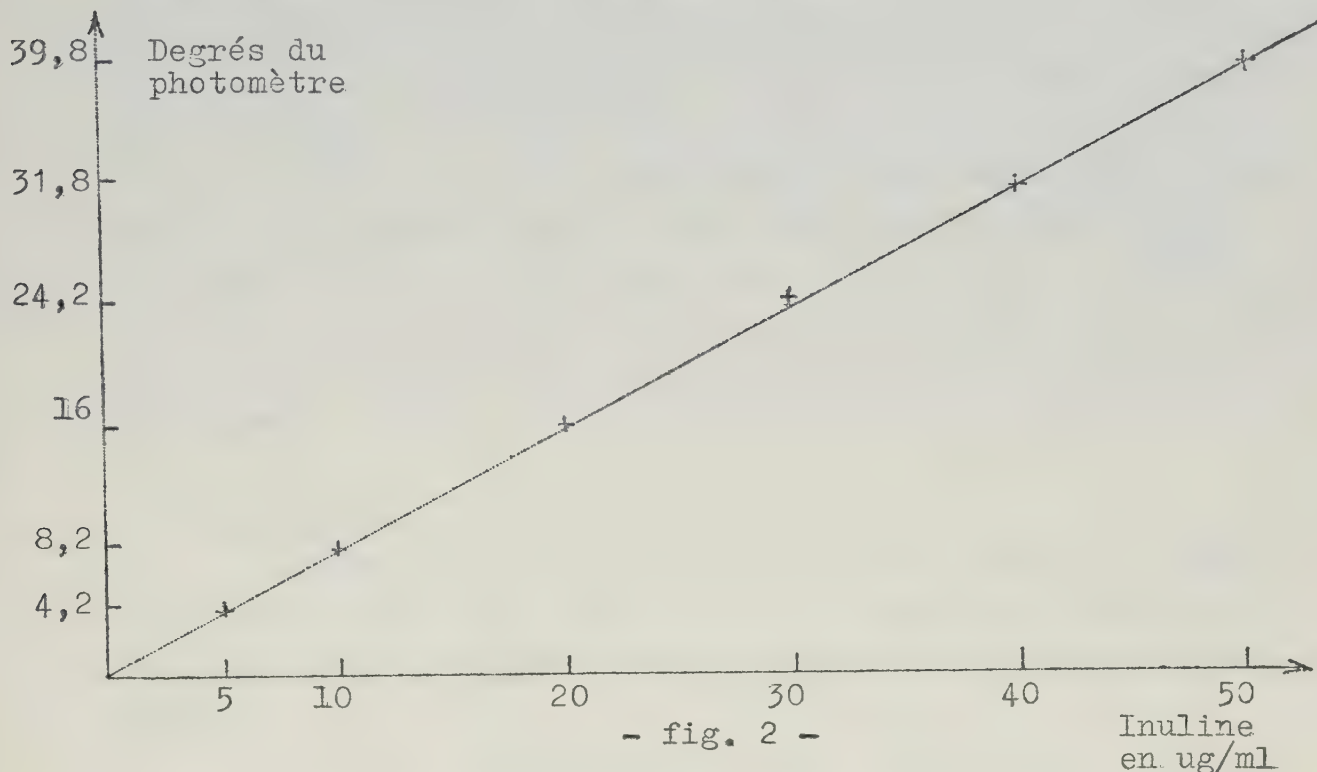
ROSS & MOKOTOFF ajoutent une quantité connue d'inuline, et lisent le blanc-muscle contre un blanc réactif contenant la même quantité d'inuline. Nous avons estimé que cela pouvait être une cause d'erreur, et nous avons directement mesuré le blanc muscle contre le blanc réactif. Le blanc réactif, utilisé pour faire le zéro du photomètre, comprend 2,4 ml de NaOH 0,85 N, 0,8 ml de HCl 2,5 N, et le mélange de SOMOGYI, soumis aux mêmes opérations que précédemment.

La densité optique correspondant au blanc dans le tissu à étudier, est ainsi calculée :

$$D. O. \text{ blanc-tissu} \times \frac{3}{2} \times \frac{\text{poids du tissu à étudier}}{\text{poids du tissu-blanc}}$$

La valeur moyenne est de 1,3 division du photomètre pour 300 mg de tissu aortique (avec volume final de 20 ml). Pour le liquide d'incubation, la valeur est de 0,1 division pour 0,1 ml de liquide dilué à 20 ml.

On fait une courbe étalon avec des solutions d'inuline contenant de 5 à 50 µg/ml. (figure 2)



L'espace de diffusion est calculé en faisant le rapport :

$$\frac{\text{concentration dans l'aorte en D.O.}}{\text{concentration dans le liquide en D.O.}}$$

et exprimé en ml pour 100 g de poids frais.

In vivo

Nous avons vu que l'étude de l'espace de diffusion de l'inuline doit se faire sur un animal néphrectomisé, placé sous anesthésie barbiturique. Les difficultés et les perturbations importantes que cela représente chez le lapin ne nous ont pas permis d'employer cette technique. Nous avons essayé d'opérer sur un animal intact.

On injecte environ 5 ml d'une solution d'inuline à

20 % par voie veineuse. Si l'animal est sacrifié 10 mn après l'injection, le rapport des concentrations dans l'aorte et dans le sérum est d'environ 20 %. Ce qui indique que très probablement, la diffusion de l'inuline dans l'aorte n'est que partielle.

Si le sacrifice est pratiqué une heure après l'injection, le rapport des concentrations est d'environ 70 % (avec une faible concentration dans le sérum). A ce moment, l'inuline a bien diffusé dans le tissu aortique, mais l'équilibre ne se réalise pas en raison de la fuite urinaire de l'inuline.

In vitro

L'aorte est placée dans 10 ml de liquide de Krebs auquel on a ajouté 0,2 ml à 0,25 ml de solution d'inuline à 20 % ; ce qui correspond à une concentration finale de 0,4 à 0,5 %.

A 0° C, après saturation du milieu en $O_2 - CO_2$, l'erlenmeyer fermé est mis dans la glace fondante, et agité de temps en temps. On laisse diffuser pendant 3 heures. Nous avons réalisé 6 mesures.

A 37°, l'incubation dans les conditions que nous avons exposées plus haut, dure une heure. Nous avons effectué 37 mesures.

ETUDE DE LA DIFFUSION DU SACCHAROSE

Nous avons opéré uniquement in vitro, avec une solution isotonique de saccharose à 10,5 % à raison de 0,5 ml pour 10 ml de tampon de KREBS.

Nous avons fait 6 mesures à 0° C avec un temps d'incubation de 2 heures, et 5 mesures à 37° C avec une heure d'incubation. Le protocole de dosage est exactement le même que celui utilisé pour l'inuline. Les valeurs obtenues sont

très élevées.

ETUDE DE LA DIFFUSION DU THIOCYANATE

Nous avons utilisé le thiocyanate de sodium purifié Prolabo.

In vivo, on injecte par voie veineuse 2 ml d'une solution à 20 % ; l'animal est sacrifié 10 mn plus tard.

In vitro, on ajoute 0,4 ml de solution de thiocyanate à 1,27 % à 10 ml de tampon de Krebs. Le temps d'incubation est de 2 heures à 0° C et une heure à 37°.

Pour le dosage, l'aorte est mise dans de l'eau distillée pendant 24 heures. Puis on ajoute 1 ml d'acide trichloracétique à 50 %, et on complète à 10 ml avec de l'eau. On agite vigoureusement, et on filtre. Le sérum ou le liquide d'incubation est dilué au 1/20e avec de l'acide trichloracétique à 5 %. On filtre. Dans la cuve du photomètre, on place 1,5 ml de filtrat, et 1,5 ml de réactif de BOWLER (7).

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3, 9 \text{ H}_2\text{O}$ 80 g NO_3H , N q.s.p. 500 ml

Après agitation, on lit immédiatement, à 470 mμ contre un blanc constitué de liquide ou de sérum ne contenant pas de thiocyanate et soumis aux mêmes opérations.

Nous avons fait 7 mesures de diffusion in vivo.

In vitro à 0° C et à 37° C, nous avons observé la diffusion totale du thiocyanate dans l'ensemble du tissu aortique, et même une certaine concentration dans l'eau tissulaire totale puisque les concentrations sont à peu près égales dans l'aorte et dans le liquide d'incubation.

ETUDE CINETIQUE DE LA PENETRATION DU PHOSPHATE RADIO-ACTIF

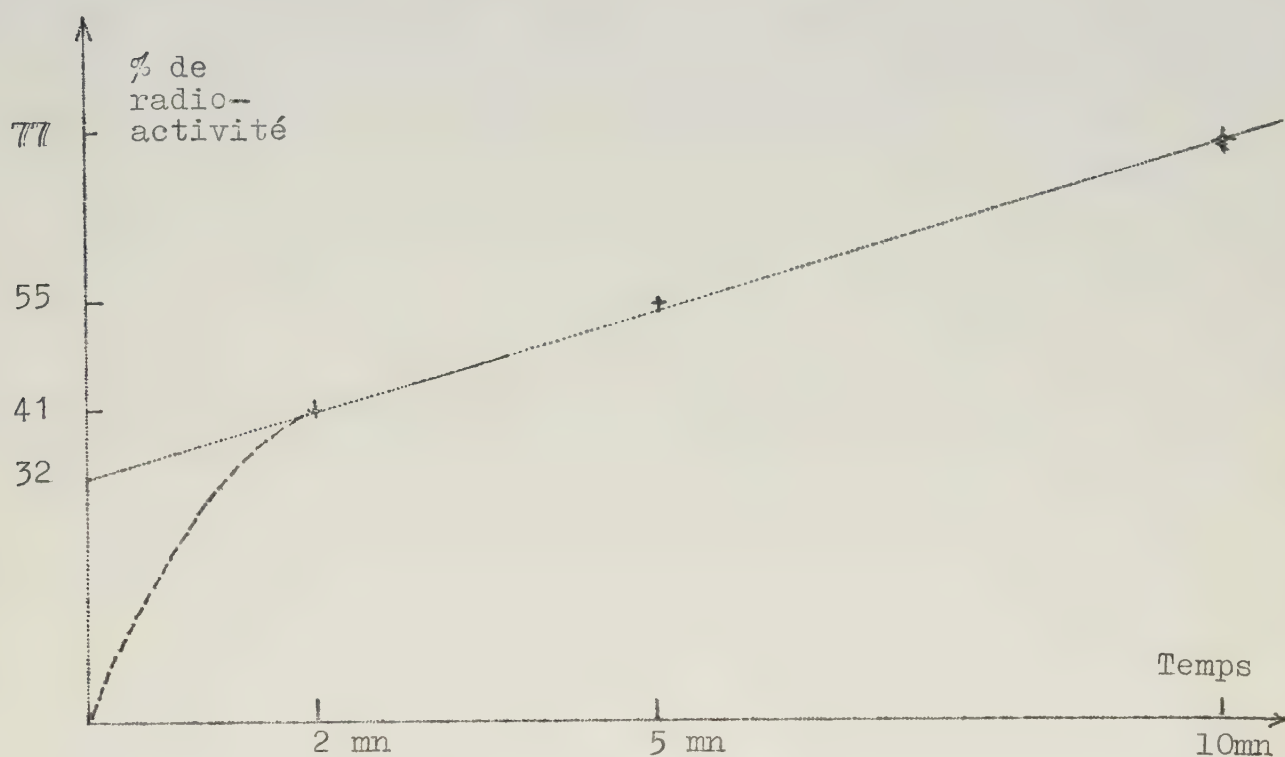
Pour cette expérimentation, nous avons utilisé du phosphate radio-actif (^{32}P) qui nous a été fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique. L'activité spécifique était de 2 mC/mM. Nous avons étudié la vitesse de pénétration du phosphate marqué en fonction du temps. Cette cinétique a été effectuée *in vitro*, en incubant l'aorte thoracique totale, rapidement prélevée et disséquée, dès le sacrifice de l'animal. Avant l'incubation, l'aorte est ouverte longitudinalement, et segmentée en 2 ou 3 fragments. Les incubations sont réalisées à 37° dans un appareil de WARBURG sous atmosphère de O_2CO_2 (95 % - 5 %) pendant respectivement 2,5 et 10 mn, en présence soit de sérum de lapin, soit de tampon de Krebs bicarbonate pH 7,4, pour un volume total de 10 ml. Le précurseur radio-actif est ajouté au temps 0 après 5 mn de thermostatisation à la dose de 20 μC .

En fin d'incubation, les fragments d'aorte sont rapidement sortis du milieu, soigneusement exprimés entre deux feuilles de papier filtre, puis sont immédiatement broyés dans un homogénéiseur BIOREX, refroidi à 0°C, en présence d'acide trichloracétique à 10 % (10/1 V/P).

Après centrifugation de l'homogénat, à 0°C pendant 20 mn à 20 000 g, on dose à partir du surnageant les nucléotides acido-solubles, ainsi que les différentes fractions phosphorylées, et on détermine parallèlement, sur des parties aliquotes, la radio-activité spécifique pour chacune des fractions ainsi isolées. On détermine parallèlement la concentration et l'activité spécifique du phosphate minéral du milieu d'incubation. La technique détaillée a

été décrite par GAUTHERON & MORELIS (15).

Pour connaître la valeur de l'espace extracellulaire, on détermine la concentration du traceur dans le tissu en pourcentage par rapport au liquide d'incubation en fonction du temps. Le résultat portant sur 4 cas pour chaque temps est représenté dans la figure 3.



- fig. 3 -

La courbe que nous représentons ici est la résultante des 4 mesures effectuées.

Les valeurs indiquées représentent donc les moyennes arithmétiques des valeurs enregistrées au cours des 4 expériences.

Nous avons tracé une courbe pour chaque mesure et déterminé sur le graphique la valeur au temps 0. La moyenne et l'erreur type sont calculées à partir des 4 valeurs au temps 0 :

$$\bar{X} \pm sm = 32 \% \pm 0,5$$

MESURE DE SURFACE SUR DES COUPES HISTOLOGIQUES

Une méthode d'évaluation de l'espace extra-cellulaire a été proposée par planimétrie des surfaces de ces espaces repérés sur coupes histologiques. Nous nous sommes procurés à cet effet, des diapositives couleur de coupes transversales d'aorte colorées à l'azan.

Les diapositives sont placées dans un lecteur de microfilms. Sur l'écran, on fixe une feuille de papier calque et on délimite au crayon, une surface entre deux lignes parallèles. A l'intérieur de cette surface, on dessine les contours des régions non colorées. On suppose évaluer ainsi la surface comprise entre les éléments musculaires (colorés en rouge brun) et les fibres conjonctives (colorées en bleu).

Le papier est pesé. On découpe ensuite, les emplacements correspondant aux régions non colorées et on les pèse. On détermine, en pourcentage, le poids des fragments découpés par rapport au poids total.

Nous avons obtenu les valeurs moyennes suivantes:

Crosse aortique: 19,5%

Partie supérieure de l'aorte thoracique: 18%

Partie inférieure de l'aorte thoracique: 24,5%

Cette méthode est loin d'être rigoureuse. Evidemment, les causes d'erreurs sont nombreuses et importantes; il est inutile d'y insister. On peut cependant estimer que ces chiffres semblent confirmer la différence entre la partie inférieure et la partie supérieure de l'aorte thoracique. On explique le fait que les valeurs soient plus faibles que celles données par la diffusion de l'inuline, en pensant que l'inuline diffuse dans les fins interstices qu'on ne peut délimiter sur l'image.

R E S U L T A T S

~~~~~

- Détermination de la valeur normale.
- Variations topographiques.
- Influence de l'adrénaline.
- Influence d'un régime athérogène.

~~~~~


DETERMINATION DE LA VALEUR DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE DE L'AORTE NORMALE.

AORTE THORACIQUE TOTALE

Pour déterminer la valeur de l'espace extra-cellulaire de l'aorte normale, nous avons employé les méthodes suivantes :

- diffusion de l'inuline à 0°C (6 mesures)
- " " " " 37°C (37 mesures)
- " du saccharose à 0°C (6 mesures)
- " " " " 37°C (5 mesures)
- " " thiocyanate in vivo (7 mesures)

L'étude porte uniquement sur la partie supérieure de l'aorte, c'est-à-dire la crosse et l'aorte thoracique à l'exclusion de l'aorte abdominale.

Ces différentes méthodes nous ont donné les résultats suivants (Tableaux I à V) exprimés en ml pour 100 g de poids frais de tissu.

Voir Tableau I page suivante.

TABLEAU I

VALEUR DE L'ESPACE DE DIFFUSION DE L'INULINE IN VITRO A 0°

! NOMBRE DE CAS !	! 6 !	! !
! RESULTATS EN !	! 28,3 !	! 28,4 !
! ml/100 g p.f.* !	! 28,8 !	! 30,9 !
! !	! 30,5 !	! 29,2 !
! MOYENNE !	! 29,4 !	! !
! ERREUR TYPE !	! $\pm 0,5$!	! !

* millilitres pour cent grammes de poids frais de tissu aortique.

TABLEAU II

VALEUR DE L'ESPACE DE DIFFUSION DE L'INULINE IN VITRO A 37°

NOMBRE DE CAS	37				
RESULTATS EN .ml/100 g p.f.	30,3	28,3	29,8	32,4	
	30,0	35,6	33,1	38,2	
	32,9	28,3	34,0	37,1	
	34,0	32,7	28,3	33,7	
	42,0	33,6	28,9	28,5	
	35,6	34,1	29,5	33,8	
	34,1	35,3	31,7	33,6	
	33,8	35,3	37,7	36,9	
	37,1	31,2	36,4	34,3	
				35,5	
MOYENNE	33,4				
ERREUR TYPE	$\pm 0,5$				

TABLEAU IIIVALEUR DE L'ESPACE DE DIFFUSION DU SACCHAROSE IN VITRO A 0°

NOMBRE DE CAS	6	
RESULTATS EN	37,5	48,1
ml/100 g p.f.	56,0	39,6
	54,6	56,5
MOYENNE	47,8	
ERREUR TYPE	$\pm 3,4$	

TABLEAU IVVALEUR DE L'ESPACE DE DIFFUSION DU SACCHAROSE IN VITRO A 37°

NOMBRE DE CAS	5	
RESULTATS EN	46,4	77,8
ml/100 g p.f.	54,8	58,1
	67,4	
MOYENNE	60,9	
ERREUR TYPE	$\pm 5,4$	

TABLEAU VVALEUR DE L'ESPACE DE DIFFUSION DU THIOCYANATE IN VIVO

NOMBRE DE CAS	7
RESULTATS EN	38,4 39,3
ml/100 g p.f.	39,2 43,3
	43,5 38,3
	43,9
MOYENNE	40,8
ERREUR TYPE	± 1

Choix de la méthode

Pour nos études ultérieures, et en fonction des résultats obtenus, nous avons choisi la diffusion de l'inuline in vitro à 37°. Etant donné que chaque mesure nécessite le sacrifice d'un lapin, il ne nous a pas été possible de réaliser un grand nombre de mesures pour chaque technique. D'ailleurs, très vraisemblablement, le saccharose pénètre largement dans les cellules, et ces mesures ont peu d'intérêt. Nous avons également rejeté la méthode au thiocyanate ; ce traceur semble avoir une sélectivité extra-cellulaire assez fragile. Ainsi, in vitro et sous l'action de l'adrénaline in vivo, il diffuse dans la totalité du tissu.

Par ailleurs, le choix de la méthode à l'inuline est justifié par le fait que les valeurs obtenues sont tout

à fait superposables à celles que nous avons déterminées en utilisant le phosphate marqué comme traceur.

ETUDE DES VARIATIONS TOPOGRAPHIQUES

Dans cette étude, il s'agit de voir les variations possibles de l'espace liquidien extra-cellulaire suivant les divers secteurs de l'aorte.

Nous avons étudié la diffusion de l'inuline dans l'aorte totale, de la naissance du coeur à la bifurcation iliaque ; l'incubation est faite in vitro, à 37°, pendant une heure. Après incubation, l'aorte est coupée en 5 fragments :

- la crosse aortique
- la partie supérieure de l'aorte thoracique
- la partie inférieure de l'aorte thoracique
- la partie supérieure de l'aorte abdominale
- la partie inférieure de l'aorte abdominale

Nous avons délimité ces cinq fragments au jugé, sans utiliser de critères anatomiques précis, si ce n'est la délimitation par le diaphragme entre aorte thoracique et aorte abdominale.

Les fragments sont pesés séparément, et l'inuline est dosée dans chacun d'eux par la méthode de ROSS & MOKOTOFF en utilisant pour la digestion alcaline et la déprotéinisation une quantité deux fois moindre de réactifs avec un volume final de 10 ml. On fait d'autre part le dosage sur 0,1 ml de liquide d'incubation. Nous avons pris comme "blanc-tissu" la valeur moyenne obtenue dans les expériences précédentes, c'est-à-dire 1,3 division du photomètre pour 150 mg de tissu, dilués à 10 ml. Nous avons effectué ces mesures sur 10 aortes.

Les résultats sont donnés dans le Tableau VI.

TABLEAU VI

VARIATIONS TOPOGRAPHIQUES DE LA VALEUR DE L'ESPACE DE DIFFUSION
DE L'INULINE IN VITRO A 37°C

VALEUR NORMALE 33,4 ± 0,5		CROSSE AORTIQUE	AORTE THORAC. SUP.	AORTE THORAC. INF.	AORTE ABDOMI. SUP.	AORTE ABDOMI. INF.
NOMBRE DE CAS : 10	1	31,4	32,7	39,1	41,4	44,0
	2	32,7	37,1	41,5	58,9	59,6
	3	36,8	28,2	36,9	54,8	56,6
	4	32,1	28,5	40,6	50,5	44,1
	5	30,2	24,7	30,3	43,6	50,4
	6	34,7	27,8	40,8	45,3	55,9
	7	37,7	34,7	39,0	57,7	57,3
	8	34,8	38,7	39,9	49,8	57,2
	9	31,4	38,3	40,9	57,1	52,8
	10	35,8	32,8	41,8	42,3	56,2
$\bar{X} \pm sm$	33,8±0,8	32,3±1,5	39,1±1,1	49,5±2,2	53,4±1,7	
F	12,68	1,38	23,7	112	218	
F 0,05	251	251	4,06	4,06	4,06	
F 0,01	6286	6286	7,24	7,24	7,24	
SIGNIFICATION	-	-	++	++	++	

L'étude statistique des résultats a été conduite par analyse de variance selon le test F.

Pour la crosse et la partie supérieure de l'aorte thoracique, il n'y a pas de variation significative par rapport à l'aorte thoracique totale, ce qui est logique. Il faut toutefois noter, si on examine les résultats isolément, qu'il y a des différences notables entre les deux fragments.

Pour la partie inférieure de l'aorte thoracique, il y a une augmentation très significative. De même pour les fragments de l'aorte abdominale.

Il existe donc d'importantes variations suivant les différents fragments considérés. En conséquence, il est difficile de mener à bien des études, faisant intervenir l'espace extra-cellulaire si on utilise indifféremment divers fragments de tissu aortique.

INFLUENCE DE L'ADRENALINE SUR LA VALEUR DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE.

Nous avons étudié l'action de l'adrénaline in vitro à différentes concentrations, et in vivo par injection intra-veineuse. Nous avons opéré sur l'aorte thoracique totale. En effet, des expériences préliminaires sur des fragments se sont révélées interprétables, étant donné les variations topographiques dont nous avons rapporté les valeurs au chapitre précédent.

Nous avons utilisé la l.adrénaline Prolabo. On prépare une solution 10^{-2} M qui est conservée à + 4°C. Cette solution est ensuite diluée au moment de l'emploi pour obtenir la dose désirée. Nous avons, là encore, utilisé des lapins mâles de race commune pesant de 2,500 à 3,500 kg.

ACTION DE L'ADRENALINE IN VITRO

Les animaux sont sacrifiés par fracture de la colonne cervicale. L'aorte prélevée, et rapidement disséquée, est placée dans 10 ml de milieu isotonique de KREBS (22) contenant environ 0,4 % d'inuline à 37°C sous courant gazeux d'O₂/CO₂, et agitation continue, comme il a été dit précédemment. Au bout de 50 mn, on ajoute une quantité d'adrénaline connue sous un volume d'environ 0,05 ml. On laisse agir 10mn. A ce moment, l'aorte est sortie du bain, puis rapidement disséquée, séchée et pesée. L'inuline est dosée, comme précédemment, par la méthode de ROSS & MOKOTOFF.

Nous avons étudié l'action de l'adrénaline à la concentration de $3 \times 10^{-8}M$, soit environ 5 μg par litre de milieu d'incubation sur 10 aortes, et à $2,2 \times 10^{-7}M$ soit environ 40 μg par litre, sur 10 aortes également.

Les résultats figurent dans les tableaux VII et VIII. L'étude statistique des résultats a été conduite par analyse de variance selon le test F.

Nous avons constaté une augmentation très significative de la valeur de l'espace de diffusion de l'inuline. La valeur moyenne étant de $38,0 \pm 1,4$ ml/100 g de poids frais, pour une concentration de $3 \times 10^{-8}M$, et de $41,6 \pm 1$ pour une concentration de $2,2 \times 10^{-7}M$.

Voir pages suivantes les tableaux VII et VIII.

TABLÉAU VII

ACTION DE L'ADRENALINE IN VITRO SUR LA VALEUR DE L'ESPACE
DE DIFFUSION DE L'INULINE IN VITRO A 37°C.

Concentration de l'adrénaline : 3×10^{-8} M.

NOMBRE DE CAS	10
RESULTATS EN mL/100 g p. f.	39,1 34,8 36,8 37,8 30,9 44,9 33,3 41,7 37,3 43,2
MOYENNE	38,0
ERREUR TYPE	$\pm 1,4$
VALEUR NORMALE	$33,4 \pm 0,5$
F	13
F 0,05	4,06
F 0,01	7,24
SIGNIFICATION	+ +

TABLEAU VIII

ACTION DE L'ADRENALINE IN VITRO ($2,2 \times 10^{-7}M$) SUR LA VALEUR
DE L'ESPACE DE DIFFUSION DE L'INULINE IN VITRO A 37°C.

NOMBRE DE CAS	10
RESULTATS EN ml/100 g p. f.	44,0 40,0 42,4 43,0 43,7 41,7 39,6 35,0 40,3 46,4
MOYENNE	41,6
ERREUR TYPE	$\pm 1,0$
VALEUR NORMALE	$33,4 \pm 0,5$
F	74
F 0,05	4,06
F 0,01	7,24
SIGNIFICATION	+ +

ACTION DE L'ADRENALINE IN VIVO

Nous avons utilisé l'adrénaline à la dose de 23 µg par kg de poids, c'est-à-dire $1,25 \times 10^{-7}$ Mole /kg. L'adrénaline est administrée par voie intra-veineuse lente, sous un volume d'environ 2 ml dans la veine marginale de l'oreille. On laisse agir l'adrénaline 10 mn, puis on sacrifie l'animal. L'aorte est prélevée, et mise en incubation dans le liquide de Krebs contenant 0,4 % d'inuline comme précédemment.

Au bout d'une heure, l'aorte est disséquée, séchée et pesée.

Les résultats obtenus sur 10 aortes sont donnés dans le tableau IX. (voir page suivante)

TABLEAU IX

ACTION DE L'ADRENALINE ADMINISTREE IN VIVO ($1,25 \times 10^{-7}$ M/kg)
SUR LA VALEUR DE L'ESPACE DE DIFFUSION DE L'INULINE IN
VITRO A 37°C.

NOMBRE DE CAS	10
RESULTATS EN ml/100 g p. f.	34,6 36,6 44,5 37,1 39,0 38,7 40,4 39,3 49,8 43,5
MOYENNE	40,3
ERREUR TYPE	$\pm 1,4$
VALEUR NORMALE	$33,4 \pm 0,5$
F	29,13
F 0,05	4,06
F 0,01	7,24
SIGNIFICATION	+ +

On constate une augmentation très significative de la valeur de l'espace de diffusion de l'inuline, qui passe de 33,4 à 40,3 $\pm$ 1,4 ml/100 g p. f.

Donc, in vivo ou in vitro, on retrouve les mêmes effets : l'espace de diffusion de l'inuline est augmenté.

INFLUENCE D'UN REGIME ATHEROGENE
SUR LA VALEUR DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE

Nous avons utilisé trois lots d'animaux, lapins mâles de race commune. Le régime comprend :

- 1 % de cholestérol
- 3 % d'huile d'olive
- 10 % de caséine

Un lot d'animaux est sacrifié après un mois de régime, le deuxième après deux mois, et le troisième après trois mois.

Nous avons étudié la diffusion de l'inuline in vitro à 37°C. Le protocole est exactement le même que pour l'aorte normale.

Les résultats portent sur 11 cas (1er mois)
14 cas (2e mois)
13 cas (3e mois)

et figurent dans les tableaux X, XI, et XII.

L'étude statistique des résultats a été conduite par analyse de variance selon le test F.

Au premier mois, l'espace de diffusion ne varie pas de manière significative. Par contre, dès le deuxième mois, nous constatons une augmentation très significative qui se maintient jusqu'à la fin du 3e mois.

TABLEAU X

INFLUENCE DU REGIME ATHEROGENE SUR LA VALEUR DE L'ESPACE
DE DIFFUSION DE L'INULINE IN VITRO A 37°C.

Résultats après un mois de régime.

NOMBRE DE CAS	11
RESULTATS EN ml/100g p. f.	36,6 40,7 37,9 36,8 33,4 32,7 30,8 27,9 33,4 44,7 35,4
MOYENNE	35,4
ERREUR TYPE	$\pm 1,4$
VALEUR NORMALE	$33,4 \pm 0,5$
F	2,75
F 0,05	4,05
F 0,01	7,21
SIGNIFICATION	-

TABLEAU XI

INFLUENCE DU REGIME ATHEROGENE SUR LA VALEUR DE L'ESPACE
DE DIFFUSION DE L'INULINE IN VITRO A 37°C.

Résultats après deux mois de régime.

NOMBRE DE CAS	14
RESULTATS EN ml/100 g p. f.	36,5 28,1
	34,6 45,2
	46,4 41,5
	38,1 43,4
	35,3 36,1
	46,2 42,2
	28,1 40,3
MOYENNE	38,7
ERREUR TYPE	$\pm 1,6$
VALEUR NORMALE	$33,4 \pm 0,6$
F	16,49
F 0,05	4,04
F 0,01	7,19
SIGNIFICATION	+ +

TABLEAU XII

INFLUENCE DU REGIME ATHEROGENE SUR LA VALEUR DE L'ESPACE
DE DIFFUSION DE L'INULINE IN VITRO A 37°C.

Résultats après trois mois de régime.

NOMBRE DE CAS	13
RESULTATS EN ml/100 g p. f.	41,8 33,8 39,6 41,0 40,0 48,8 36,1 33,7 36,8 40,0 34,2 39,6 43,3
MOYENNE	39,1
ERREUR TYPE	$\pm 1,2$
VALEUR MOYENNE	$33,4 \pm 0,5$
F	25,3
F 0,05	4,04
F 0,01	7,19
SIGNIFICATION	+ +

D I S C U S S I O N



- Détermination de la valeur normale.
- Influence de l'adrénaline.
- Influence d'un régime athérogène.



DETERMINATION DE LA VALEUR NORMALE

Lorsque nous avons abordé cette première partie de notre travail, nous ne disposions d'aucune donnée préalable, puisque la revue de la littérature scientifique concernant l'espace extra-cellulaire de l'aorte ne nous avait pas permis de relever d'expérimentation concernant le tissu aortique du lapin. Seules avaient été étudiées en effet, l'aorte de rat (14), la carotide et l'aorte de chien (25). La même incertitude demeurerait concernant l'utilisation sélective d'une méthode déterminée en raison de la multiplicité même de ces techniques, qui fait que l'on trouve difficilement dans la littérature des valeurs superposables pour un tissu donné. C'est la raison essentielle qui nous a orienté dans cette première partie de notre travail vers une étude systématique des principales techniques utilisées pour la détermination de la valeur de l'espace liquidien extra-cellulaire de l'aorte de lapin.

Cependant, récemment, LORENZETTI, TYE & NELSON (23) ont mesuré l'espace extra-cellulaire de l'aorte de lapin par l'étude de la diffusion de l'inuline in vitro dans des fragments d'aorte thoracique. Les fragments sont des rubans de 2mm de large et 2 cm de long obtenus en faisant tourner contre une lame fixe l'aorte montée sur une tige de verre. Cette opération est effectuée dans une solution de Krebs bicarbonaté, avec courant gazeux de 95 % O_2 - 5 % CO_2 . Les fragments incubent dans du liquide de Krebs bicarbonaté contenant 1 % d'inuline. La technique de dosage utilise une coloration par l'anthrone. Les auteurs ne donnent aucun chiffre précis, les résultats étant exprimés sous forme de graphique.

Approximativement, les valeurs sont les suivantes :

- 30 mn	38 %	du poids frais		
- 1 heure	52 %	"	"	"
- 2 "	55 %	"	"	"
- 3 "	71 %	"	"	"
- 4 "	80 %	"	"	"

Nous voyons qu'au bout de 3 heures d'incubation, l'inuline a diffusé dans la totalité du secteur hydrique du tissu ; ceci est tout à fait inhabituel, et n'a pas été constaté dans les tissus aortiques d'autres espèces animales (14, 25). D'autre part, après une heure d'incubation, la valeur est de 52 ± 4 %. Nous n'avons jamais obtenu de chiffre aussi élevé sur 37 mesures portant sur l'aorte thoracique entière. Par contre, nous avons constaté des valeurs voisines (42 à 59%) sur une aorte coupée longitudinalement en 4 fragments. Il semble donc que ces valeurs très élevées seraient en rapport avec des lésions tissulaires.

Il faut également noter que les auteurs ne précisent ni le nombre de mesures, ni la température d'incubation, ni l'existence d'un système d'agitation, ni le maintien d'un courant gazeux au cours de l'opération.

Remarquons enfin que les auteurs prennent pour poids frais le poids du tissu ayant séjourné 12 heures dans l'eau distillée.

Nous avons eu connaissance de ce travail, alors que nos expérimentations étaient terminées. Les différences peuvent s'expliquer par le fait que les conditions expérimentales sont également différentes. La valeur que nous donnons est très voisine de celle de l'espace de diffusion de l'inuline dans

l'aorte de rat et a été confirmée par la mesure à l'aide du phosphate radioactif.

Pour pouvoir discuter les valeurs normales que nous avons enregistrées, nous devons rappeler ici que les méthodes utilisées par différents auteurs se ramènent à l'utilisation de traceurs qui diffusent sélectivement dans l'espace liquidien extra-cellulaire sans pénétrer dans les cellules. Parmi les traceurs les plus utilisés figurent essentiellement l'inuline, le saccharose, le raffinose, le thiocyanate et l'albumine marquée. En dehors de ces composés, certains auteurs ont préconisé l'utilisation de traceurs sous forme ionique, naturelle ou radio-active, tels que le brome, le chlore, le lithium, le sodium, le phosphate, dont il s'agit, non pas d'étudier le volume de distribution, mais la vitesse de pénétration, étant donné que ces ions pénètrent dans les cellules à une vitesse différente de celle à laquelle ils pénètrent dans le liquide extra-cellulaire.

Parmi ces nombreuses méthodes, nous avons retenu celles qui utilisent comme traceur : l'inuline, le saccharose in vitro à différentes températures, et le phosphate radio-actif ; le thiocyanate pour la détermination in vivo. En effet, en raison de la multiplicité de ces méthodes, il ne nous était pas possible d'envisager de les utiliser toutes. Nous avons donc choisi d'utiliser les méthodes les plus couramment employées.

Avant d'envisager la discussion proprement dite de nos résultats, il convient de souligner aussi certaines difficultés inhérentes à ces méthodes, et les risques d'erreurs

auxquels leur interprétation peut conduire dans certains cas. La difficulté générale de ces méthodes réside dans le fait qu'on n'a jamais la certitude que le traceur diffuse uniformément dans l'espace liquidien extra-cellulaire, et ne pénètre pas à l'intérieur des cellules. Ce qui explique que les valeurs obtenues varient pour un même tissu selon le composé utilisé. D'une façon générale, on peut supposer que la taille de la molécule intervient dans la valeur obtenue. En effet, les petites molécules peuvent diffuser plus ou moins à l'intérieur des cellules, alors qu'inversement, les grosses molécules diffusent plus difficilement dans les espaces intersticiels. Par ailleurs, il est difficile d'exclure le fait que certains traceurs peuvent être partiellement métabolisés.

Enfin, l'utilisation des traceurs radio-actifs se heurte à une difficulté qu'il ne faut pas méconnaître, et qui réside dans le fait que certains traceurs pénètrent extrêmement rapidement dans les cellules, comme le sodium (16) ce qui interdit toute détermination.

Il semble donc que le meilleur critère permettant de penser qu'on est parvenu à une détermination satisfaisante est d'obtenir des valeurs très voisines avec au moins deux méthodes différentes.

Dans ces méthodes, l'étude de la diffusion de l'inuline a incontestablement une place de choix. La revue de la littérature scientifique montre qu'elle est de loin la plus utilisée, et que les valeurs obtenues sont généralement satisfaisantes, en ce sens qu'elles sont largement inférieures à la valeur de l'eau totale. Les autres méthodes sont sujettes à des variations d'importance variable, selon le

tissu étudié et le mode opératoire.

L'ensemble des résultats obtenus qui sont rapportés dans le tableau XIII, appellent certains commentaires.

TABLEAU XIII

VALEURS DE L'ESPACE EXTRA-CELLULAIRE DE L'AORTE THORACIQUE
TOTALE OBTENUES AVEC LES DIFFERENTES METHODES UTILISEES.

CONDITIONS	IN VITRO						IN VIVO
Traceur	Inuline		Saccharose		32 P		Thio- cyanate
Température	0° C	37° C	0° C	37° C	37° C		
Nombre de cas	6	37	6	5	4		7
$\bar{X} \pm sm$ (ml/100 g) p.f.	29,4 $\pm$ 0,5	33,4 $\pm$ 0,5	47,8 $\pm$ 3,4	60,9 $\pm$ 5,4	32 $\pm$ 0,5		40,8 $\pm$ 1

Nous voyons qu'en ce qui concerne les méthodes à l'inuline in vitro, il n'existe pas de différence notable entre les valeurs obtenues selon que la détermination a été effectuée à 0°C ou à 37°C. La légère différence peut être rapprochée des variations constatées par VIDLAKORA & KLEINZELLER (37) concernant l'hydratation totale du tissu en fonction de la température.

Il est intéressant de noter

que la valeur moyenne que nous avons obtenue (33,4 ml/100 g de p. f.) est très proche de celle obtenue par FRIEDMAN & Coll. (14) pour l'aorte de rat, in vivo (31,9 ml/100g p.f. dégraissé).

Par contre, en ce qui concerne les méthodes au saccharose, nous relevons des différences importantes par rapport aux valeurs obtenues avec la méthode à l'inuline. Cette différence a déjà été relevée par certains auteurs dans d'autres tissus (8, 26). Dans tous les cas, les valeurs de l'espace extra-cellulaire obtenues par la méthode au saccharose sont supérieures à celles déterminées par la méthode à l'inuline. Dans notre expérimentation, cette différence est particulièrement importante. Ceci peut s'expliquer, comme nous l'avons déjà souligné, par le fait que le saccharose qui est une petite molécule, pénètre au moins en partie dans les cellules. Effectivement, au cours de certaines expériences avec le saccharose, nous avons trouvé des valeurs allant jusqu'à 77,8 %, ce qui correspond, environ, à l'eau totale du tissu. Ce qui prouve que le saccharose a diffusé totalement dans le secteur hydrique.

En ce qui concerne le thiocyanate, la même difficulté peut se rencontrer. En effet, au cours d'expériences parallèles, faisant appel au thiocyanate in vitro, nous avons noté une diffusion totale de ce composé, et même une concentration dans le secteur hydrique, puisque l'espace de diffusion obtenu est voisin de 100 % du poids frais. Nous avons eu de bien meilleurs résultats in vivo, puisque la valeur de l'espace ainsi déterminé (40,8 ml/100 g p. f.) n'est pas très différente de celle obtenue avec l'inuline à 37°C.

Enfin, l'utilisation du phosphate radio-actif nous a permis de corroborer les résultats obtenus par la méthode à l'inuline in vitro à 37°, étant donné que les valeurs déterminées par ces deux méthodes se recoupent parfaitement.

Ce fait joint au grand nombre d'expériences effectuées avec l'inuline (37 cas) nous a fait choisir cette technique pour nos expérimentations portant sur l'influence de l'adrénaline et du régime athérogène sur la valeur de l'espace extra-cellulaire.

INFLUENCE DE L'ADRENALINE

Dans cette deuxième partie de notre travail, nous avons étudié les modifications de l'espace extra-cellulaire sous l'influence de l'adrénaline *in vivo* et *in vitro*, en utilisant la méthode à l'inuline pour les raisons invoquées au chapitre précédent.

Dans l'étude générale portant sur le renouvellement des nucléotides du tissu aortique et les variations des vitesses de renouvellement induites par l'adrénaline, il était important de déterminer parallèlement les variations de l'espace extra-cellulaire sous l'influence de cette hormone.

Comme le font ressortir nos résultats, rassemblés dans le tableau XIV, l'adrénaline provoque *in vitro* et *in vivo* une augmentation statistiquement significative de la valeur de l'espace extra-cellulaire.

Voir tableau XIV page suivante.

TABLEAU XIV

ACTION DE L'ADRENALINE SUR L'ESPACE DE DIFFUSION DE
L'INULINE, IN VITRO A 37°C.

		IN VITRO		IN VIVO
DOSE	0	$3 \times 10^{-8} \text{ M}$	$2,2 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1,25 \times 10^{-7}$ mole/kg
NOMBRE DE CAS	37	10	10	10
$\bar{X} \pm \text{sm}$ (ml/100g p.f.)	$33,4 \pm 0,5$	$38,0 \pm 1,4$	$41,6 \pm 1$	$40,3 \pm 1,4$
F		13	74	29,13
F 0,05		4,06	4,06	4,06
F 0,01		7,24	7,24	7,24
SIGNIFICATION		+ +	+ +	+ +

In vitro, la valeur de l'espace extra-cellulaire passe de 33,4 ml/100 g p.f. pour les témoins à 38 ml pour une concentration égale à $3 \times 10^{-8} \text{ M}$, et à 41,6 ml pour une concentration égale à $2,2 \times 10^{-7} \text{ M}$.

In vivo, on note le même effet, puisque l'adrénaline utilisée à la concentration de $1,25 \times 10^{-7}$ mole/kg entraîne une augmentation de la valeur de l'espace extra-cellulaire d'environ 20 %.

En utilisant la méthode au phosphate radio-actif, après injection intra-veineuse d'adrénaline ($1,25 \times 10^{-7}$ mole/kg), HENRY & COLL.⁽¹⁸⁾ ont trouvé une valeur identique confirmant ainsi l'augmentation de l'espace extra-cellulaire que nous avons mise en évidence.

D'autres auteurs (15) ont constaté, également, cette augmentation de la valeur de l'espace extra-cellulaire sous l'influence de l'adrénaline dans d'autres tissus.

Cet effet de l'adrénaline pourrait s'expliquer par une action directe sur la membrane cellulaire selon l'hypothèse de BULBRING (9).

Il est d'autre part très intéressant de rapprocher cette augmentation de l'espace extra-cellulaire avec l'oedème constaté par ANCLA & COLL (2) sur des coupes d'aortes de lapin après administration d'adrénaline, et que nous avons précédemment signalé.

INFLUENCE D'UN REGIME ATHEROGENE

L'administration d'un régime athérogène de type hypercholestérolé provoque, chez le lapin, au niveau de l'aorte, une infiltration lipidique cellulaire qui précède les remaniements intéressant le tissu conjonctif qui n'apparaissent qu'après plusieurs mois de régime.

Ces données histologiques permettent d'expliquer les variations de l'espace extra-cellulaire du tissu aortique, enregistrées au cours de notre expérimentation dont les résultats globaux figurent dans le tableau XV.

TABLEAU XV

INFLUENCE D'UN REGIME ATHEROGENE SUR L'ESPACE DE DIFFUSION DE L'INULINE IN VITRO A 37°C.

TEMPS DE REGIME	0	1 mois	2 mois	3 mois
NOMBRE DE CAS	37	11	14	13
$\bar{X} \pm sm$ ml/100 g p.f.	33,4 $\pm$ 0,5	35,4 $\pm$ 1,4	38,7 $\pm$ 1,6	39,1 $\pm$ 1,2
F		2,75	16,49	25,3
F 0,05		40,5	4,04	40,4
F 0,01		7,21	7,19	7,19
SIGNIFICATION		-	++	++

Notre expérimentation a porté sur trois lots d'animaux traités respectivement pendant un mois (11cas) 2 mois (14 cas), et 3 mois (13 cas).

Comme le fait ressortir le tableau XV, on constate que, sous l'influence d'un régime riche en cholestérol (1 %), une augmentation progressive de la valeur de l'espace extra-cellulaire a lieu au cours du régime.

Toutefois, il faut noter que cette augmentation ne devient significative qu'après 2 mois de régime, l'augmentation enregistrée étant de l'ordre de 15 % après 3 mois de régime. Il n'existe pas de modification notable par rapport à la valeur moyenne obtenue après 2 mois.

Il est intéressant de rapprocher cette augmentation statistiquement significative, observée après 2 mois de traitement, du fait que les lésions macroscopiques apparaissent en général au niveau de l'aorte entre la 8e et la 11e semaine de régime.

Il semble donc bien que l'on puisse rapporter cette augmentation de la valeur de l'espace extra-cellulaire dans le tissu aortique, aux modifications histologiques dont ce tissu est le siège sous l'influence du régime athérogène.

CONCLUSIONS

L'étude de la valeur de l'espace liquidien extra-cellulaire de différents tissus a été abordée par de nombreux auteurs. Le nombre très restreint de travaux concernant le tissu aortique nous a amené à déterminer avec précision la valeur de cet espace de diffusion, et à étudier les modifications induites par la l-adrénaline d'une part, et un régime athérogène d'autre part. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une étude générale portant sur le métabolisme de la paroi aortique.

De nombreuses techniques ont été mises au point à ce jour, que nous avons analysées dans la première partie de notre travail. Parmi celles-ci, nous avons expérimenté dans la deuxième partie les techniques utilisant la diffusion in vitro du thiocyanate, du saccharose, de l'inuline et du phosphate radio-actif. Nous avons également étudié la diffusion du thiocyanate in vivo.

La confrontation des résultats nous a conduit à retenir la technique de diffusion de l'inuline in vitro à 37°C pour aborder l'étude des modifications de la valeur de l'espace extra-cellulaire, provoquées par l'adrénaline ou un régime hyper-cholestérolé.

La comparaison des résultats d'ensemble que nous avons obtenus pour le tissu aortique, a mis en évidence les points suivants :

1- La valeur de l'espace extra-cellulaire de l'aorte thoracique totale chez le lapin normal est de

33,4 ml/100 g de poids frais. Cette valeur présente des variations en fonction de la topographie aortique. Elle est en effet de 39,1 ml/100 g pour l'aorte thoracique inférieure, de 49,5 ml/100 g pour l'aorte abdominale supérieure, et de 53,4 ml/100 g pour l'aorte abdominale inférieure.

2- On observe une augmentation significative de la valeur de l'espace extra-cellulaire sous l'influence de la l-adrénaline in vivo et in vitro.

3- Sous l'influence d'un régime athérogène, on note également une augmentation significative de la valeur de l'espace extra-cellulaire après deux mois de régime.

Les valeurs observées et leurs modifications après injection de l-adrénaline, et dans une moindre mesure au cours de l'établissement du processus athérogène par un régime hypercholestérolé, peuvent s'expliquer par la structure histologique et les remaniements de cette structure.

Le Président de la Thèse :

D. VINCENT

VU et permis d'imprimer

LYON, le 25 avril 1967

VU, le Doyen,

J.F. CIER

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. ALVING (A.S.), RUBIN(J.) and MILLER(B.F.)
A direct colorimetric method for the determination of inulin in blood and urine.
J.Biol.Chem. 127, 609, (1939)
2. ANCLA(M.), DE BRUX(J.), CALVARIN(R.) et KAUFMANN(H.)
Modifications de la paroi aortique du lapin sous l'action de l'adrénaline.
Agressologie 7, 563, (1966)
3. BARR(L.) and MALVIN(R.L.)
Estimation of extra-cellular space of smooth muscle using different sized molecules.
Amer.J.Physiol. 208, 1042, (1965)
4. BIERRING(F.) and KOBAYASI(T.)
Electron microscopy of the normal rabbit aorta.
Acta.Path.Microbiol.Scand. 57, 154, (1963)
5. BITMAN(J.), CECIL(H.C.), HAWK(H.W.) and SYKES(J.F.)
Effect of oestrogenes and progesterone on water and electrolytes content in rabbit uteri.
Amer.J.Physiol. 197, 93, (1959)
6. BOURKE(R.S.), GREENBERG(E.S.) and TOWER(D.B.)
Variation of cerebral cortex fluids spaces in vivo as a function of a species brain sizes.
Amer.J.Physiol. 208, 682, (1965)
7. BOWLER(R.G.)
The determination of thiocyanate in blood serum.
Biochem.J. 38, 385, (1944)
8. BOZLER(E.) and LAVINE(D.)
Permeability of smooth muscle.
Amer.J.Physiol. 195, 45, (1958)

9. BULBRING(E.)
Biophysical changes produced by adrenaline and noradrenaline.
Ciba Foundation Symposium on adrenergic mechanism 1960 ,
p.275
10. COTLOVE(E.)
Mechanism and extent of distribution of inuline and sucrose in chloride space of tissues.
Amer.J.Physiol. 176, 396, (1954)
11. CRANDALL(L.A.) and ANDERSON(M.X.)
Amer.J.Dis. 1, 126, (1934)
12. DANIEL(E.E.) and ROBINSON(K.)
The secretion of sodium and uptake of potassium by isolated uterine segments made sodium rich.
J.Physiol. 154, 421,(1960)
13. DAVENPORT(H.W.)
Sodium space and gastric secretion in frog gastric mucosa
Amer.J.Physiol. 204, 213, (1963)
14. FRIEDMANN(S.M.),SRETER(F.A.),NAKASHIMA(M.) and FRIEDMANN(C.L.)
Adrenal cortex and neurohypophysal deficiency in salt and water homeostasis of rats.
Amer.J.Physiol. 203, 697, (1962)
15. GAUTHERON(D.) et MORELIS(R.)
Variations de la vitesse de renouvellement des fractions phosphorylées et des nucléotides libres dans le muscle sous l'influence de l'adrénaline.
Bull.Soc.Chim.Biol. 47,1923, (1965)
16. GOODFORD(P.J.) and HERMANSEN(K.)
Sodium and potassium movements in the unstriated muscle of the guinea pig taenia coli.
J.Physiol. 158, 426, (1961)

17. HALKERSTON(I.D.K.), EICHHORN(J.), FEINSTEIN(M.),
SCULLY(E.) and HECHTER(O.)
Early permeability effects of oestradiol on castrate
rat uterus.
Proc.Soc.Exp.Biol. 103, 796, (1960)
18. HENRY(J.C.)
Communication personnelle.
19. HIGASHI(A.) and PETERS(L.)
A rapid method for the determination of inulin in
plasma and urine.
J.Lab.Clin.Med. 35, 475, (1950)
20. HUBBARD(R.S.) and LOCMIS(T.A.)
The determination of inulin.
J.Biol.Chem. 145, 641, (1942)
21. KENDALL YOUNG(J.R.) and RAISZ(L.G.)
An anthrone procedure for determination of inulin in
biological fluids.
Proc.Soc.Exp.Biol. 80, 771, (1952)
22. KREBS(H.A.)
Body size and tissue respiration.
Biochim.Biophys.Acta 4, 249, (1950)
23. LORENZETTI(O.J.), TYE(A.) and NELSON(J.W.)
Effect of glyceryl trinitrate on extracellular space
of aortic strips.
J.Pharm.Sci. 55, 977, (1966)
24. MATRAY (F.)
Quelques aspects du métabolisme du muscle lisse et de ses
modifications sous l'influence de l'adrénaline. Thèse
doctorat ès Sciences. Paris 1961.
25. NORMAN (A), RONDELL (P.A.) and BOHR (D.F.)
Determination of extra-cellular fluid space from small
samples of tissues. Amer. J. Clin. Path. 32, 469, (1959)

26. PAPPUS (H.M.) and ELLIOT (K.A.C.)
Water distribution in incubated slices of brain and other tissues. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 34, 1007, (1956)
27. PERCHERON (F.)
Dosage colorimétrique des ceto-hexoses par l'acide thio-barbiturique. *Bull. Soc. Chim. France*, 2, 1684, (1963)
28. PERCHERON (F.), YONGER (J.) et BEDU-SAADA (J.)
Dosage colorimétrique du fructose dans le sang au cours des épreuves de charge en fructose. *Ann. Biol. Clin.* 21, 645, (1963).
29. PERRIN (A.), DELAHAYE (J.P.) et GONIN (A.)
Athérome humain et expérimental : évolution chronologique composée des lésions - Actualités cardio-vasculaires médico-chirurgicales 2e série (1965), 52-65. Masson Ed.
30. PROSSER (C.L.), BURNSTOCK (G) and KAHN (J.)
Conduction in smooth muscle : comparative structural properties. *Amer. J. Physiol.* 199, 545, (1960)
31. ROE (J.H.), EPSTEIN (J.H.) and GOLDSTEIN (N.P.)
A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. Biol. Chem.* 178, 839, (1949).
32. ROSS (G.) and MOKOTOFF (R.)
Determination of inulin in muscle. *J. Biol. Chem.* 190, 659, (1951)
33. SCHREINER (G.E.)
Determination of inulin by means of resorcinol. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 74, 117, (1950)
34. SOMOGYI (M.)
A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar. *J. Biol. Chem.* 86, 655, (1930)
35. VALETTE (G.), COHEN (Y.) et BRALET (J.)
Action de l'éphédrine sur l'aorte de rat in vitro : étude à l'aide de la noradrénaline ¹⁴C. *Biochem. Pharmacol.* 15, 177, (1966).

36. VIDLAKOVA (M.) and KLEINZELLER (A.)

Distribution of water and electrolytes in pigeon gizzard slices and rabbit aortic strips. *Physiol. Bohemoslov* 12, 196, (1963).

37. VIDLAKOVA (M.) and KLEINZELLER (A.)

Active transport of electrolytes in the smooth muscle of pigeon gizzard and rabbit aorta. *Physiol. Bohemoslov.* 12, 202, (1963).

38. VOLFIN (P.), CLAUSER(H.) et EBOUE (D.)

Influence de l'œstradiol de la progestérone sur la vitesse de renouvellement du phosphate minéral et des nucléotides libres de l'utérus de rat. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 44, 205, (1962).

39. WEIL (W.B.)

Préparation of a stable form of inulin for tissue analysis *Proc. Soc. exp. Biol.*, 80, 103, (1952).

40. ZENDER (R.) et FALBRIARD (A.)

Analyse colorimétrique des ceto-hexoses et de l'inuline par la réaction à l'acide thiobarbiturique. Conditions de la réaction. *Clin. Acta* 13, 246, (1966).
